



Immuno-analyse & Biologie Spécialisée



Volume 28 /2013

 LEMONDEDESPHARMACIENS

 [LEMONDEDESPHARMACIENS](https://www.facebook.com/Le.Monde.Des.Pharmaciens/)

 [#LemondedesPharm](https://twitter.com/LemondedesPharm)



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Test septine 9 et cancer colorectal ou comment améliorer son dépistage

Septin 9 assay: How to improve colorectal cancer screening

B. Baudin ^{a,b,*}

^a Laboratoire de biochimie et biologie cellulaire (EA-4530), UFR pharmacie, université Paris-Sud-11, 5, rue Jean-Baptiste-Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

^b Pôle de biologie médicale et pathologie, service de biochimie A, hôpitaux universitaires Est-Parisien, hôpital Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France

Reçu le 4 octobre 2012 ; accepté le 5 octobre 2012

KEYWORDS

Septin9;
Colorectal cancer;
Intestinal polyposis;
Epigenetics;
DNA methylation;
Plasma DNA;
Fecal occult blood test;
Screening

Summary Colorectal cancer (CRC) is the second cause of cancer-related mortality although its early detection allowed the survival rate to increase up to 90%. The most common screening test in France is the classical fecal occult blood test (Hemoccult®) performed in families and individuals at risk, and now systematically every two years in individuals after 50 years. New biomarkers have yet appeared, particularly with the detection of hypermethylated DNA in stools or blood plasma. Gene methylation is an epigenetic phenomenon often associated with carcinogenesis, especially CRC, DNA extracted from normal tissues being not or poorly methylated, allowing the normal transcription of the gene and the expression of the protein. Recently, a new plasma assay detecting methylated DNA of a septin variant (Sept9 assay) was developed. Septins are proteins from the cytoskeletal, linked to microtubules and actin fibers; they are GTPases associated with a number of cellular functions such as cytokinesis and vesicular trafficking. They form a great family with at least 13 members that are assembled into hetero-oligomers forming filaments and rings. Among ubiquitous septins, septin9 was rapidly associated with CRC with the development of a blood-based assay (« septin9 DNA methylation assay » from Epigenomics), sensitive and specific, allowing the screening quality to be improved with better compliance in targeted populations. Septin9 assay detects adenomas (polyposis) of more than 1 cm (generally not cancerous), increases in positivity in function of the evolution stage (stages I to IV), and remains negative in normal individuals as verified with colonoscopy. This new non stool-based assay could compete with stool-based assays in development such as immunologic detection.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Pôle de biologie médicale et pathologie, service de biochimie A, hôpitaux universitaires Est-Parisien, hôpital Saint-Antoine, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France.
Adresse e-mail : bruno.baudin@sat.aphp.fr

MOTS CLÉS

Septine 9 ;
Cancer colorectal ;
Polypes intestinaux ;
Épigénétique ;
Méthylation de
l'ADN ;
ADN plasmatique ;
Sang dans les selles ;
Dépistage

Résumé Le cancer colorectal (CCR) reste la seconde cause de mortalité par cancer bien que sa détection précoce ait permis d'augmenter le taux de survie à plus de 90 %. Le test de dépistage de masse utilisé actuellement en France est la classique recherche de sang dans les selles (Hemoccult®) chez les personnes et familles à risque, et maintenant systématiquement tous les deux ans après 50 ans. De nouveaux bio-marqueurs sont apparus, en particulier avec la recherche d'ADN hyperméthylé dans les selles ou le plasma sanguin. La méthylation des gènes est un phénomène épigénétique souvent associé à la cancérogenèse, et en particulier au CCR, l'ADN des tissus sains étant peu ou pas méthylé, ce qui permet une transcription normale du gène et l'expression de la protéine. Récemment est apparu un test plasmatique mesurant l'ADN-méthylé d'un variant de la septine 9 (test Septine 9). Les septines sont des protéines du cytosquelette, reliées aux microtubules et aux fibres d'actine ; ce sont des GTPases associées à de multiples fonctions cellulaires essentielles comme la cytocinèse et le trafic vésiculaire. Elles forment une grande famille de plus de 13 membres qui s'assemblent en hétéro-oligomères formant des filaments ou des anneaux. Parmi les septines ubiquitaires, la septine 9 a été rapidement incriminée dans le CCR, menant au développement d'un test de détection plasmatique (« septin9 DNA methylation assay » d'Epigenomics), sensible et spécifique, qui permettrait d'améliorer la qualité du dépistage avec une meilleure compliance des populations ciblées. Le test Septine 9 détecte des adénomes (polypes) de plus de 1 cm (généralement non cancéreux), est d'autant plus positif que le stade du cancer est avancé (stades I à IV), et reste négatif chez les individus sains vérifiés par coloscopie. Ce nouveau test non-fécal pourrait concurrencer les tests en cours d'implantation, essentiellement fécaux comme les tests immunologiques.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Le cancer colorectal : épidémiologie, étiologie et dépistage

Les tumeurs du côlon et du rectum restent fréquentes et sont encore souvent fatales si le diagnostic est posé tardivement. Bien que la détection précoce du cancer colorectal (CCR) ait permis d'augmenter le taux de survie à plus de 90 %, ce cancer demeure la seconde cause de mortalité par cancer, derrière le cancer de la prostate et le cancer du poumon chez les hommes, derrière le cancer du sein chez les femmes. En 2011, 140 000 nouveaux cas ont été détectés aux États-Unis, et 40 500 en France, avec 50 000 décès cette année-là aux États-Unis pour 17 500 décès en France. Les hommes sont plus touchés que les femmes ; l'incidence du cancer du poumon étant en augmentation chez les femmes, le CCR sera bientôt la troisième cause de mortalité par cancer chez les femmes, comme chez les hommes, sauf chez les non-fumeurs pour lesquels le cancer bronchique est rare. L'incidence du CCR augmente avec l'âge ; comme les populations vieillissent rapidement, on doit s'attendre à une augmentation du nombre de nouveaux cas. Plus le CCR est diagnostiqué précocement, plus il va bénéficier des progrès thérapeutiques, en particulier en termes de prise en charge chirurgicale. Le traitement passe toujours par l'exérèse de la tumeur ; à l'examen anatomopathologique, on retrouve le plus souvent un adénome ou polype adénomateux (Stade I). Les stades supérieurs correspondent à un envahissement de la sous-séreuse ou d'un organe voisin (Stade IIa), ou du péritoine (Stade IIb), avec des ganglions métastatiques régionaux (Stade III, A, B ou C selon le nombre), ou avec des métastases à distance, au foie essentiellement (Stade IV). La survie à cinq ans passe de 90 % lorsque la tumeur est au Stade I à 8 % lorsque le diagnostic est réalisé sur une tumeur au Stade IV. Dans 95 % des cas, on retrouve un adénocarcinome ; les cancers colloïdes ou mucineux sont plus rares. Tous les arguments sont réunis pour justifier l'intérêt d'un dépistage

précoce du CCR afin de réaliser l'exérèse le plus tôt possible, assurer le diagnostic anatomopathologique, établir un pronostic et définir une ligne thérapeutique complémentaire au premier acte chirurgical (reprise chirurgicale du ou des polypes, chimiothérapie, radiothérapie...).

Les causes du CCR sont multiples et intriquées. Les formes purement héréditaires sont rares (moins de 5 % des cas sont des polyposes familiales avec des mutations du gène *Apc*, ou plus sporadiquement dans les voies de transduction du signal reliées à *Apc*, comme les voies Notch et Wnt). Les maladies inflammatoires chroniques du côlon, comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, favorisent le développement du CCR. De nombreux facteurs environnementaux sont incriminés, au rang desquels on trouve la consommation ou surconsommation de tabac, d'alcool, de viandes rouges et de charcuteries ; la sédentarité favoriserait aussi la survenue de CCR. Des mesures de prévention primaire sont prises dans tous les pays pour faire diminuer la fréquence du CCR ou au moins amortir l'augmentation prévisible du nombre de cas par le vieillissement des populations. Cela passe par l'incitation à l'arrêt du tabac, à la diminution de la consommation d'alcool et de viandes, tout en favorisant la consommation de légumes et de fruits, et la pratique d'activités physiques ou sportives.

Devant une telle fréquence de ce cancer et une telle gravité liée à l'évolution rapide du CCR, le dépistage a montré son intérêt en diminuant la mortalité en quelques années. La méthode la plus simple, et qui a fait l'objet du premier dépistage est la fameuse « recherche de sang dans les selles ». Ce test est basé sur le fait qu'un polype qui saigne est en cours de différenciation cancéreuse avec néovascularisation ; c'est l'érosion de ces nouveaux microvaisseaux qui est l'origine de l'apparition de sang dans les selles. Le plus souvent ce saignement est occulte, donc on

ne le voit pas à l'œil nu. Le test de dépistage doit donc être plus sensible que l'examen visuel. Les premiers tests ont montré cette sensibilité; ils sont basés sur la mise en évidence d'hémoglobine dans les selles (test gaïac Hemoccult® qui utilise les propriétés peroxydasiques de l'hémoglobine, réaction positive en présence de peroxyde d'hydrogène). Ce test n'est pas spécifique du CCR car tout saignement dans le tube digestif, ainsi que la consommation récente de viandes rouges, positivent le test Hemoccult (actuellement le test Hemoccult II). Il n'est néanmoins pas suffisamment sensible car l'adénome comme la tumeur peuvent ne pas saigner ou pas au moment du recueil des selles. Il faut donc réaliser le test sur plusieurs jours de suite (trois généralement) pour limiter les faux-positifs et s'assurer d'un saignement chronique potentiellement d'origine colorectale; le gastro-entérologue s'assurera de l'absence de facteurs confondants. La spécificité peut être améliorée par la détection de l'hémoglobine humaine grâce à des anticorps. Les tests immuno-chimiques par hémagglutination (HemeSelect®), par Elisa (Feca EIA®), par agglutination de particules de latex (OC Hemodia®) ou par immunodiffusion radiale (Detectacol®) sont plus sensibles que les tests au gaïac, mais leur coût élevé limite leur utilisation dans le dépistage de masse. Toutefois, en France, le Plan Cancer 2009–13 a prévu de développer ces tests immunologiques sur l'ensemble du territoire. L'enjeu est de taille; depuis la mise en œuvre du programme de dépistage en 2003, plus de 13 500 CCR ont été dépistés, ainsi que plus de 54 000 adénomes dont 31 000 cas à risque de transformation en CCR. Selon l'INCa, le taux de participation et la notoriété de ce dépistage sont en forte progression: 90% des personnes interrogées en 2009 connaissaient l'existence d'un dépistage du CCR, taux en nette progression par rapport à celui de la précédente enquête menée en 2005. Une nouvelle campagne menée par l'INCa en début d'année 2012 (Mars Bleu 2012) a tenté d'améliorer la compliance au test de dépistage, c'est-à-dire à faire mieux participer les plus de 50 ans en levant le tabou de la récolte du prélèvement fécal, geste jugé comme gênant par une part importante de cette population, d'ailleurs plus les hommes que les femmes (en 2011, moins d'une personne de plus de 50 ans sur deux ayant reçu une sollicitation à réaliser ce test l'a fait effectivement).

Dans le cas où le test est positif (2 à 3% des cas), une coloscopie doit être réalisée pour confirmer ou infirmer la suspicion de lésion cancéreuse. La coloscopie est le moyen le plus fiable pour diagnostiquer un polype ou un cancer; c'est l'examen de référence (*gold standard*). Il permet d'observer la muqueuse de l'anus jusqu'à la jonction iléo-colique et de faire des prélèvements. Si l'on constate un polype, celui-ci sera enlevé entièrement, puis analysé en laboratoire d'anatomopathologie. La coloscopie traditionnelle se fait sous anesthésie générale; elle tend à être remplacée dans certaines indications par le coloscanner, réalisé sans anesthésie générale, mais nécessitant une distension colique qui peut se faire avec un lavement à l'eau ou avec une insufflation de gaz carbonique. Un radiologue formé à cette technique peut atteindre un taux de détection des lésions significatives supérieur à celui obtenu par coloscopie; mais le coloscanner ne permet pas la résection du polype. Il a été montré sur de

grandes cohortes que, en commençant par le coloscanner, on pouvait réduire de 90% le nombre de coloscopies nécessaires.

Ainsi, même si le test Hemoccult ne détecte qu'un cancer sur deux, il reste intéressant en termes de santé publique puisque ce dépistage permet de réduire la mortalité due au CCR de près de 16%. Des nouveaux tests de dépistage apparaissent; ils ne sont pas tous basés sur la détection du sang dans les selles. Certains tests mesurent un marqueur sanguin, ce qui pourrait non seulement améliorer la compliance au dépistage, mais aussi diminuer la mortalité par CCR en augmentant la sensibilité (moins de faux-négatifs) tout en diminuant le nombre de coloscopies inutiles, améliorant la spécificité (moins de faux-positifs) [1–6].

Épigénétique et tests de méthylation de l'ADN

La plupart de ces nouveaux tests détectent la méthylation de l'ADN circulant; ce sont des tests de génétique moléculaire. L'expression des gènes peut être régulée par ce qu'on appelle l'épigénétique; il s'agit de modifications chimiques portant sur l'ADN ou les histones (méthylation de l'ADN et des histones, acétylation des histones) activant ou désactivant des gènes gouvernant la biosynthèse de protéines. Certains microARN et ARN non-codants interviennent aussi dans les régulations épigénétiques de la transcription. On s'intéresse particulièrement à la méthylation de l'ADN car elle est stable, facile à mesurer et parce que son rôle dans le cancer est bien établi, ainsi que dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et le lupus systémique. La méthylation de l'ADN se fait sur des cytosines d'îlots riches en GpC et situés dans les zones promotrices des gènes; la formation de méthyl-5 cytosine activera ou désactivera le gène hyperméthylé. Cette méthylation particulière est catalysée par des ADN-méthyltransférases, dont la transcription est elle-même régulée classiquement et par épigénétique. Dans le cancer, la méthylation des gènes va surtout inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs, comme p53 et p16. Les altérations génétiques et épigénétiques s'installent progressivement au cours de la transformation tumorale montrant une grande instabilité génétique et épigénétique des cancers. Dans le CCR, il a été montré que ces altérations étaient plus nombreuses dans les tumeurs au Stade IV que dans celles au Stade III, plus nombreuses dans le Stade III que dans le Stade II, mais aussi plus nombreuses dans le Stade II que dans le Stade I (adénomes), et même plus nombreuses dans les adénomes que dans la muqueuse sans polype. Normalement, l'ADN du plasma (que l'on sait détecter depuis plus de dix ans) est peu méthylé; dans le cancer, et en particulier dans le CCR, l'ADN plasmatique est hyperméthylé. Plusieurs tests diagnostiques ou utiles au dépistage, ont ainsi été développés, comme la détection d'ADN-méthylé dans les selles pour le dépistage du CCR, la détection d'ADN-méthylé dans les urines pour le dépistage des cancers de la prostate et de la vessie ou encore dans le tampon Papvirus® utilisé pour la détection des cancers du col et de l'utérus (le même tampon peut être utilisé pour la recherche d'ADN-méthylé), ou encore dans le sang pour le diagnostic de leucémies ou de

diverses tumeurs solides, comme le « septin9 DNA methylation assay » pour la détection du CCR. L'hyperméthylation de l'ADN est un caractère phénotypique dont la détection favoriserait l'émergence d'une médecine personnalisée basée sur la mesure de nouveaux bio-marqueurs d'états pathologiques utilisés unitairement ou en technologie multiplexe [7–9].

Les septines et la septine 9

La firme Epigenomics a introduit en 2009 un nouveau test, Epi Procolon® ou « septin9 assay » (test Septine 9), qui mesure l'hyperméthylation du gène codant la septine 9 (« septin9 DNA methylation assay ») [10]. Les septines sont des GTPases qui contrôlent la cytoténèse ; elles ont été découvertes chez la levure comme étant des éléments du cytosquelette localisés dans l'anneau contractile : l'assemblage dynamique des filaments de septines vient former un « sablier » qui va se scinder en deux anneaux distincts entre la cellule mère et le bourgeon. Cet anneau contractile est responsable de la septation entre cellule mère et bourgeon (reproduction non sexuée de la levure) [11]. Les septines sont retrouvées dans l'ensemble du monde vivant, sauf peut-être chez les plantes supérieures. Elles sont très conservées entre les espèces ; on en connaît maintenant au moins 13. Le domaine central est le même pour toutes (il porte le site de liaison du GTP), mais les extrémités N- et C-terminales sont beaucoup plus variables menant à des masses moléculaires allant de 30 à 65 kDa pour le monomère. S'y ajoutent de nombreuses modifications post-traductionnelles, essentiellement des phosphorylations et des ubiquitinations [12]. Les septines sont classées en quatre groupes phylogéniques : le groupe de la septine 2 (septines 1, 2, 4 et 5), le groupe de la septine 3 (septines 3, 9 et 12), le groupe de la septine 6 (septines 6, 8, 10, 11 et 14) et le groupe de la septine 7 (septine 7 seule). Les monomères de septines (Sept) s'arrangent en hétéro-oligomères qui peuvent être des trimères (par exemple dans l'association palindromique Sept7-Sept6-Sept2-Sept2-Sept6-Sept7) ou des tétramères qui se combinent par substitution (par exemple Sept2-Sept6-Sept7-Sept9). Ces trimères et tétramères s'associent pour former des filaments et des anneaux [12–15]. Chez les mammifères, les septines interviennent dans la division cellulaire par interaction avec les cytosquelettes d'actine et de microtubules, et semblent jouer un rôle important dans l'organisation des membranes et le trafic vésiculaire [12, 16].

Le gène codant la septine 9 (Sep9) peut être transcrit sous forme de sept variants (transcriptions alternatives et variations d'épissage d'introns), donnant des isoformes protéiques différentes par leurs extrémités N- et/ou C-terminales (sur les 13 exons, les exons 1 à 3 et 12, 13 sont les plus variables) [13, 17]. L'importance de la Sept 9 en pathologie est grandissant ; en infectiologie, on a mis en évidence son rôle dans l'internalisation des virus et des bactéries intracellulaires (interactions hôte/pathogène) [18]. Elle interviendrait dans la physiopathologie de maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer [19]. Mais c'est en cancérologie que la sept 9 semble la plus intéressante ; la première mise en évidence fut dans la

leucémie myéloïde aiguë en relation avec une translocation, puis des associations ont été trouvées entre des tumeurs solides et des gènes proches de celui de la Sept 9 dans le chromosome 17q25 (dans l'espèce humaine). Par exemple, des mutations du variant $\Delta 4$ de la Sept 9 ont été découvertes dans des tumeurs de l'ovaire, alors qu'on ne les retrouvait pas dans le tissu sain [20]. Le variant $\Delta 1$ était surexprimé dans des cellules MCF7 (cancer du sein) résistantes aux chimiothérapies ; cette surexpression modifierait la dynamique des microtubules menant à des mitoses anormales et à l'altération de l'apoptose [21]. Dans des tumeurs de la prostate, la surexpression du variant $\Delta 4$ de la Sept 9 stabiliserait le facteur de transcription HIF-1 α relié à l'hypoxie, ce qui favoriserait la croissance tumorale et l'angiogenèse [22]. La méthylation du promoteur du gène sept 9 s'accompagnait d'une diminution de la transcription du variant $\Delta 2$ dans des tumeurs colorectales et d'autres tumeurs solides de la tête, du cou, de l'ovaire et du sein [23]. Le variant $\Delta 3$ a aussi été incriminé dans le cancer du sein [24]. Dans la lignée tumorale colique HT-29, Töth a montré que l'hyperméthylation du gène *Sept 9* s'accompagnait d'une diminution d'expression du variant $\Delta 1$ jugée en ARN messager et en protéine, effets inhibés par l'ajout de déméthylases [25].

Le test Septine 9 dans le dépistage du cancer colorectal

En 2008, paraît une première publication du groupe de recherche d'Epigenomics à Seattle aux États-Unis : par l'emploi d'un microarrays de 56 ADN-méthylés candidats, Lofton-Day et al. ont découvert l'hyperméthylation des gènes *TMEFF2*, *NGFR* et *Sept 9* dans des tumeurs coliques ; *TMEFF2* est une protéine transmembranaire à domaine « EGF-like » (ressemblant au récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* [EGF]), et *NGFR* est le récepteur au *Nerve Growth Factor*. Cette première étude a été réalisée sur une petite cohorte de patients porteurs de CCR [26]. Grützmann et al., à Dresde en Allemagne, ont éprouvé le « septin9 DNA methylation assay » (Epi Procolon® d'Epigenomics) comme nouveau bio-marqueur du CCR ; ils ont montré l'hyperméthylation du gène *Sept 9* (mesurée sur l'ADN plasmatique) dans 48 % des CCR et seulement 7 % des témoins sains dans une première cohorte expérimentale formée de 252 CCR et 102 témoins. Dans une seconde cohorte, dite de validation, formée de 126 CCR, 183 témoins, 168 « polypes » non cancéreux et 411 autres maladies du côlon, ils ont confirmé ces premiers résultats en montrant une sensibilité de 72 % et une spécificité de 90 % pour ce test de détection du CCR [10]. Ces auteurs ont aussi démontré une corrélation entre la teneur en ADN hyperméthylé et le stade évolutif ; 62 % des CCR aux Stades I/II étaient détectés, dont des tumeurs asymptomatiques et indépendamment de la localisation dans le côlon transverse, le sigmoïde ou le rectum. La limite de détection était supérieure à 1 cm pour les polypes avec, à ce seuil, seulement 20 % de détection. Ainsi les petits polypes cancéreux, certainement peu vascularisés, ne sont pas détectés, mais la sensibilité augmente avec la taille des polypes. En 2009, ce test est apparu sur le marché américain. Il s'agit d'une

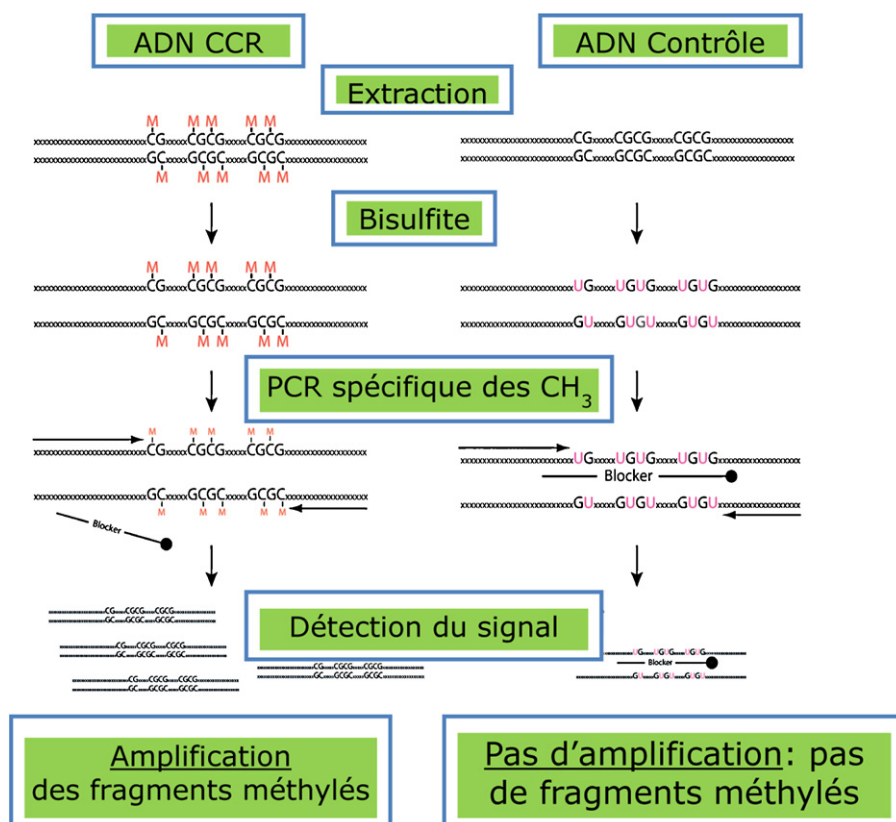


Figure 1 Schéma récapitulant les différentes étapes du test Septine 9, de l'extraction de l'ADN du plasma (patient atteint d'un cancer colorectal à gauche versus un individu sain servant de témoin à droite) à la détection de la PCR spécifique des méthyles (CH₃) et du variant Δ 1 du gène de la septine 9 (selon Epi Procolon-Septin9 DNA Methylation Assay®) [10,26].

PCR quantitative ; en quelques mots, il faut extraire l'ADN à partir d'un prélèvement sanguin effectué au pli du coude sur un tube EDTA de 10 mL ; le plasma est séparé par centrifugation puis éclairci par une deuxième centrifugation. La deuxième étape consiste à convertir par le bisulfite les cytosines en uraciles ; les cytosines méthylées des îlots CpG ne sont pas converties. La troisième étape est une PCR spécifique des cytosines méthylées du promoteur du gène que l'on veut amplifier, ici la séquence exonique codant le variant Δ 1 de la Sept 9 ; seul l'ADN-méthylé sera amplifié par liaison de la sonde spécifique ; pour s'en assurer, une sonde bloquante empêche l'ADN réactif au bisulfite (uraciles formées) de fixer la sonde d'amplification (Fig. 1). Le test Septine 9 a été ensuite optimisé dans toutes ses étapes : purification de l'ADN sur microbilles magnétiques séparées par ultracentrifugation, bisulfite dissout en solvant « scavenger » de radicaux libres augmentant le taux de conversion en favorisant la désulfonation, diminution des volumes, PCR quantitative en plaques 96 puits et technologie FRET (fluorescence) menant à des analyses à haut débit intéressantes pour le dépistage de masse [27]. La sensibilité analytique est de trois copies d'ADN par millilitre ; la linéarité est estimée par dilution d'échantillons très positifs et de standards. Globalement, la sensibilité reste vers 70 % avec une spécificité à plus de 93 %. Il a ensuite été proposé d'associer la Sept 9 à d'autres marqueurs candidats du CCR pour une analyse multiplexe d'ADN-méthylés, par exemple avec TMEFF2 et ALX4 (un gène homeobox interagissant avec

un activateur lymphoïde et dont le produit est un facteur de transcription contrôlant le développement osseux). La sensibilité est améliorée (atteignant 87 %) avec une spécificité qui reste bonne (vers 90 %) [28]. Il a été montré que ce test multiplexe non invasif peut être utilisé à grande échelle pour une détection précoce du CCR.

Autres nouveaux tests de dépistage du cancer colorectal

L'ADN-méthylé peut aussi être détecté dans les selles (*Stool DNA testing*) ; plusieurs configurations d'analyses multiplexes ont été proposées [29–32], et éprouvées contre le test Septine 9 [33]. En particulier, Ahlquist et al. ont récemment montré qu'un multiplexe (*multimarker test for stool DNA*) alliant des mutations ADN (mutant du gène *KRAS*) et des méthylations des gènes *BMP3*, *NDRG4*, *vimentine* et *TFPI2*, plus le gène β -actine et la mesure de l'hémoglobine fécale, atteignait une sensibilité de 85 % avec une spécificité de 90 % pour la détection du CCR, et avec une sensibilité qui augmentait avec la taille de l'adénome [32]. Cette même équipe a ensuite comparé ce multiplexe au test Septine 9 montrant la supériorité du multiplexe en termes de sensibilité [33]. De nombreuses revues font régulièrement le point sur les performances comparées des tests sanguins (donc non-fécaux) entre eux ou avec les tests fécaux [34,35].

Conclusion

L'intérêt pour les septines en général, et pour la septine 9 en particulier, va croissant depuis la découverte d'une forte relation positive entre l'hyperméthylation de l'ADN Sep9 plasmatique et le développement du cancer colorectal. Le test Septine 9 est assez sensible pour détecter des tumeurs de moins d'un cm ; les faux-positifs sont très peu nombreux (moins de 10 %), ce qui devrait mener à diminuer le nombre de coloscopies inutiles. Il reste à savoir si ce test peut être adapté à un dépistage de masse, seul ou en association à d'autres tests, épigénétiques ou non. Des recherches sont aussi menées dans d'autres types de cancers (sein, ovaire, prostate et vessie surtout), et parfois avec d'autres septines [36]. Ces nouveaux tests plasmatiques devraient améliorer la compliance puisqu'ils ne nécessitent pas de recueil de matières fécales. En revanche, ils ne sont pas forcément plus sensibles que les nouveaux tests fécaux, épigénétiques, immunologiques ou autres, tels que l'étude des selles par résonance magnétique nucléaire qui serait la plus sensible. Beaucoup de travaux doivent encore être menés pour connaître l'impact du dépistage par épigénétique, qu'il soit plasmatique ou fécal.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Cancer du côlon. Wikipédia, http://fr.wikipedia.org/wiki/Cancer_du_colon
- [2] Ballinger AB, Anggiansah C. Colorectal cancer. *Brit Med J* 2007;335:715–8.
- [3] Cancer colorectal. Document d'information pour les médecins traitants. Institut national du cancer (INCa).
- [4] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919–32.
- [5] Les Français face au dépistage des cancers. Enquête barométrique INCa/BVA-janvier/février 2009.
- [6] Johnson CD, Mei-Hsiu Chen, Toledano AY, et al. Accuracy of CT colonography for detection of large adenomas and cancers. *N Engl J Med* 2008;359:1207–17.
- [7] Weber M, Schübeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:273–80.
- [8] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148–59.
- [9] Bock C. Epigenetic biomarker development. *Epigenomics* 2009;1:99–110.
- [10] Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS One* 2008;3:e3759.
- [11] Weirich CS, Erzberger JP, Barral Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:478–89.
- [12] Spiliotis ET, Nelson WJ. Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci* 2006;119(Pt1):4–10.
- [13] Peterson EA, Petty EM. Conquering the complex world of human septins: implications for health and disease. *Clin Genet* 2010;77:511–24.
- [14] Sirajuddin MM, Farkasovsky M, Hauer H, et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* 2007;449:311–5.
- [15] Sandrock K, Bartsch I, Blaser S, et al. Characterization of human septin interactions. *Biol Chem* 2011;392:751–61.
- [16] Spiliotis ET, Kinoshita M, Nelson WJ. A mitotic septin scaffold required for mammalian chromosome congression and segregation. *Science* 2005;307:1781–5.
- [17] Osaka M, Rowley JD, Zelnick-Le NJ. MSF (MLL septin-like fusion), a fusion partner gene of MLL, in a therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;17)(q23;25). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6428–33.
- [18] Hall PA, Russell SE. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 2004;204:489–505.
- [19] Kinoshita A, Kinoshita M, Akiyama H, et al. Identification of septins in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998;153:1551–60.
- [20] Russell SE, McIlhatton MA, Burrows JF, et al. Isolation and mapping of a human septin gene to a region on chromosome 17q, commonly deleted in sporadic epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 2000;60:4729–34.
- [21] Kalikin LM, Sims HL, Petty EM. Genomic and expression analyses of alternatively spliced transcripts of the MLL septin-like fusion gene (MSF) that map to a 17q25 region of loss in breast and ovarian tumors. *Genomics* 2000;63:165–72.
- [22] Amir S, Golan M, Mabjeesh NJ. Targeted knockdown of SEPT9.v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway. *Mol Cancer Cell* 2010;8:643–52.
- [23] Bennet KL, Lee W, Lamarre E, et al. HPV status-independent association of alcohol and tobacco exposure or prior radiation therapy with promoter methylation of FUSSEL18, EBF3, IRX1, and SEPT9, but not SLC5A8, in head and neck squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:319–26.
- [24] Connolly D, Yang Z, Castaldi M, et al. Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2011;13:R76.
- [25] Tóth K, Galamb O, Spisák S, et al. The influence of methylated septin 9 gene on RNA and protein level in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2011;17:503–9.
- [26] Lofton-Day C, Model F, DeVos T, et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2008;54:414–23.
- [27] DeVos T, Tetzner R, Model F, et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* 2009;55:1337–46.
- [28] He Q, Chen HY, Bai EQ, et al. Development of a multiplex MethylLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;202:1–10.
- [29] Zou H, Taylor WR, Harrington JJ, et al. High detection rates of colorectal neoplasia by stool DNA testing with a novel digital melt curve assay. *Gastroenterology* 2009;136:459–70.
- [30] Lind GE, Danielsen SA, Ahlquist T, et al. Identification of an epigenetic biomarker panel with high sensitivity and specificity for colorectal cancer and adenomas. *Mol Cancer* 2011;10:85.
- [31] Berger BM, Ahlquist DA. Stool DNA screening for colorectal neoplasia: biological and technical basis for high detection rates. *Pathology* 2012;44:80–8.
- [32] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology* 2012;142:248–56.

- [33] Ahlquist DA, Taylor WR, Mahoney DW, et al. The stool DNA test is more accurate than the plasma septin 9 test in detecting colorectal neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:272–7.
- [34] Payne SR. From discovery to the clinic: the novel DNA methylation biomarker (m)SEPT9 for the detection of colorectal cancer in blood. *Epigenomics* 2010;2:575–85.
- [35] Newton KF, Newman W, Hill J. Review of biomarkers in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2012;14:3–17.
- [36] Froidevaux-Klipfel L, Poirier F, Boursier C, et al. Modulation of septin and molecular motor recruitment in the microtubule environment of the Taxol-resistant human breast cancer cell line MDA-MB-31. *Proteomics* 2011;11:3877–86.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Actualités sur les tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à VIH : législation, performances, avantages et inconvénients

News on rapid tests of diagnostic orientation of HIV infection: Legislation, performance, advantages and disadvantages

A. Gautheret-Dejean^{a,b,*}

^a Service de virologie, ER1 DETIV, université Pierre-et-Marie-Curie, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

^b Service de microbiologie, faculté de pharmacie, université Paris Descartes, 75006 Paris, France

Reçu le 24 juillet 2012 ; accepté le 16 octobre 2012

KEYWORDS

Simple rapid test;
Screening;
Human
immunodeficiency
virus;
HIV;
Legislation;
Performance

MOTS CLÉS

Tests rapides
d'orientation
diagnostique ;
Dépistage ;

Summary In 2010, French legislation for the diagnosis of the infection with the human immunodeficiency virus (HIV) has changed with the publication of two decrees in May and November. Simple rapid tests for diagnosis orientation (SRTs) can now be used in a context of emergency but also for the purpose of expanding the offer of screening outside of a laboratory of medical biology (establishment and health services, medical office of city structure prevention or associative). The main advantages of HIV SRTs are: implementation on the ground closer to people, speed, simplicity of use, storage at room temperature, HIV-1/HIV-2 differentiation for some. However, they have a number of disadvantages: analytical performance (sensitivity and specificity) lower than those obtained using Elisa combined tests, subjectivity of reading, lack of traceability, HIV screening only, variability of production controls and distribution, high cost. The objectives of this review are to present the legislative framework for the use of HIV SRTs in France, their performance, advantages and disadvantages.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé En 2010, la législation française du diagnostic de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine a changé avec la parution des arrêtés des 28 mai et 9 novembre. Les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) peuvent désormais être utilisés lors de contexte d'urgence mais également dans un but d'élargissement de l'offre de dépistage en dehors d'un laboratoire d'analyse (établissement et services de santé, cabinet médical de ville, structure de prévention ou associative). Les principaux avantages des TROD VIH sont : réalisation sur le terrain au plus près des personnes, rapidité, simplicité, stockage à

* Service de virologie et ER1 DETIV, université Pierre-et-Marie-Curie, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.
Adresse e-mail : agnes.gautheret@psl.aphp.fr

Virus de
l'immunodéficience
humaine ;
VIH ;
Législation ;
Performance

température ambiante, différenciation VIH-1/VIH-2 pour certains. Cependant, ils ont un certain nombre d'inconvénients : performances analytiques (sensibilité et spécificité) inférieures à celles des tests Elisa combinés, subjectivité de lecture, manque de traçabilité, exploration du VIH uniquement, contrôles de production et distribution variables et coût élevé. Les objectifs de cette revue sont de présenter le cadre législatif de l'utilisation des TROD VIH en France, leurs performances, avantages et inconvénients.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Jusqu'en 2010, le dépistage de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, se faisait dans un laboratoire de biologie médicale par la recherche d'anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 dans le sérum ou le plasma à l'aide de deux réactifs différents revêtus du marquage CE, dont au moins un réactif utilisant une technique Elisa mixte (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (arrêté 28 avril 2003) [1]. Aucun cadre législatif n'était prévu pour les tests rapides d'orientation diagnostique (TROD).

L'évolution de l'épidémiologie de l'infection à VIH en France, de sa prise en charge, et des méthodes disponibles pour en faire le dépistage ont conduit les autorités de santé à mener une réflexion dans le cadre de la Haute Autorité de santé (HAS) sur les stratégies et les dispositifs de dépistage de l'infection par le VIH. En effet, le nombre de sujets porteurs du VIH en France, estimé à environ 150 000, ne cesse de croître avec près de 7000 à 8000 nouvelles contaminations par an [2]. Certains groupes de personnes, notamment les hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH) sont particulièrement touchés et représentent en 2010 environ 40 % des diagnostics avec une augmentation surtout chez les moins de 25 ans [3]. Les nouveaux diagnostics en 2010 concernaient pour 36 % des patients au stade précoce de l'infection (taux de lymphocytes T CD4+ [LTCD4+] > 500/mm³ sans Sida) mais également pour 30 % des patients à un stade très tardif (LTCD4+ < 200/mm³ ou stade Sida) [3]. Par ailleurs, 40 000 à 50 000 personnes ignoraient leur infection, ne pouvant ainsi pas bénéficier d'une prise en charge précoce qui a été clairement associée à une augmentation de la durée de vie, sans complication du Sida, avec les co-morbidités liées à l'âge [4–6].

Face à ces données alarmistes, les autorités de santé ont publié deux arrêtés fixant les conditions du diagnostic biologique de l'infection à VIH [7], d'une part, et de la réalisation de tests rapides d'orientation diagnostique [8], d'autre part, ainsi qu'un Plan national de lutte contre le VIH/Sida et les infections sexuellement transmissibles (IST) 2010 à 2014 [6]. Le but était de proposer de nouvelles stratégies afin d'élargir l'offre de dépistage, en particulier par les médecins généralistes et par des associatifs, afin d'aller vers des populations qui n'avaient pas recours aux structures classiques de dépistage. Dans ce cadre, les TROD sont des outils utiles par leur facilité d'utilisation et leur rapidité de réalisation, et plusieurs études ont été réalisées pour évaluer la faisabilité d'une telle démarche [9].

Les objectifs de cette revue sont de présenter le cadre législatif de l'utilisation des TROD VIH en France, leurs performances, avantages et inconvénients. Nous limiterons

notre propos aux trousseaux ayant le marquage CE et pouvant, en conséquence, être commercialisées dans l'ensemble des pays de l'Union européenne.

Définition des tests rapides d'orientation diagnostique

Le journal officiel (JO) de l'Union européenne (2009/108/CE) L 39/34 10 février 2009 [10] portant sur les spécifications techniques communes des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro définit les tests rapides comme suit : « on entend par "test rapide" les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro qualitatifs ou semi-quantitatifs, utilisés séparément ou pour une série limitée, faisant appel à des procédures non automatisées et conçus pour donner un résultat rapide ».

Dans l'arrêté du 28 mai 2010 paru au JO de la République française du 9 juin 2010, le test rapide est défini comme un « réactif à lecture subjective » [7].

Cadre législatif de l'utilisation des tests rapides d'orientation diagnostique VIH en France

L'utilisation des TROD VIH en France est soumise à une législation précise dont les fondements ont été posés en 2010 avec les arrêtés des 28 mai et 9 novembre [7,8].

Arrêté du 28 mai 2010 fixant les conditions de réalisation du diagnostic biologique de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et 2) et les conditions de réalisation du test rapide d'orientation diagnostique dans les situations d'urgence [7]

Selon l'article 1, dans un laboratoire de biologie médicale, le diagnostic de l'infection à VIH se fait sur sérum ou plasma « au moyen d'un réactif, revêtu du marquage CE, utilisant une technique Elisa à lecture objective de détection combinée des anticorps anti-VIH-1 et 2 et de l'antigène p24 du VIH-1 avec un seuil minimal de détection de l'antigène p24 du VIH-1 de deux unités internationales par millilitre.

En cas de résultat positif, une analyse de confirmation par western blot ou immunoblot est réalisée à l'initiative du biologiste médical sur le même échantillon sanguin et permet de différencier une infection à VIH-1 ou à VIH-2.

Tableau 1 Situations d'urgence pouvant justifier le recours à un test rapide d'orientation diagnostique de l'infection à VIH-1 et 2 [7].

Accident d'exposition au sang : le test rapide d'orientation diagnostique est proposé à la personne « source »
Accident d'exposition sexuelle : ce test est proposé aux partenaires
Au cours d'un accouchement : ce test est proposé à la femme enceinte de statut sérologique inconnu ou ayant été exposée depuis le dernier dépistage à un risque de transmission du VIH
Urgence diagnostique d'une pathologie aiguë évocatrice du stade Sida

Si le résultat de l'analyse de confirmation est négatif ou douteux, le biologiste médical effectue à son initiative sur le même échantillon sanguin une détection de l'antigène p24 du VIH-1, avec un réactif, revêtu du marquage CE, ayant un seuil minimal de détection de l'antigène p24 du VIH-1 de deux unités internationales par millilitre, confirmée par un test de neutralisation en cas de positivité. Lorsqu'il en a la possibilité, le biologiste médical peut réaliser à la place de cette détection, une recherche d'ARN viral plasmatique du VIH-1.

La présence des anticorps anti-VIH-1 et 2 ou de l'antigène p24 du VIH-1 chez un individu n'est validée qu'après réalisation d'un diagnostic biologique dans les conditions décrites au premier alinéa sur un échantillon sanguin issu d'un second prélèvement au moyen d'un réactif, revêtu du marquage CE, identique ou différent ».

L'article 2 précise les conditions d'utilisation des TROD VIH comme suit : « Dans les situations d'urgence prévues en annexe I du présent arrêté et dans l'impossibilité de réaliser un diagnostic biologique de l'infection à VIH-1 et 2 mentionné au premier alinéa de l'article 1^{er} dans des délais compatibles avec la prise en charge de ces situations d'urgence, un test rapide d'orientation diagnostique détectant l'infection à VIH-1 et 2 peut être pratiqué sur sang total, sérum ou plasma, au moyen d'un réactif à lecture subjective, revêtu du marquage CE, en vue d'une prise en charge médicale adaptée. ».

Quatre situations d'urgence ont été retenues pour la réalisation de TROD VIH (Tableau 1). Le test peut être réalisé par un médecin exerçant en cabinet, un médecin, un biologiste médical, une sage-femme exerçant dans un établissement ou un service de santé, un infirmier ou un technicien de laboratoire exerçant dans un établissement ou un service de santé, sous la responsabilité d'un médecin ou d'un biologiste médical. C'est le directeur de l'organisme qui désigne les personnels autorisés à réaliser ces tests.

Dans ce cadre, les professionnels de santé seront tenus de mettre en place une procédure qualité formalisée dans un document écrit. Les principaux éléments sont décrits dans le Tableau 2.

Le patient sera informé du résultat du TROD et, que celui-ci soit négatif ou positif, un diagnostic biologique sera réalisé sur un prélèvement différent de celui ayant servi au TROD, selon les conditions décrites à l'article 1 de l'arrêté (Elisa combiné ± test de confirmation).

Tableau 2 Principaux points développés dans la procédure d'assurance qualité pour la réalisation de tests rapides d'orientation diagnostique VIH par un médecin exerçant en cabinet, un médecin, un biologiste médical, une sage-femme, un infirmier ou un technicien de laboratoire exerçant en cabinet (médecin) ou dans un établissement ou un service de santé [7].

La formation accomplie pour pratiquer le test rapide d'orientation diagnostique, l'interpréter et en remettre le résultat
Les recommandations du fabricant du test rapide d'orientation diagnostique pour son utilisation
Les modalités de la traçabilité des tests utilisés et de leurs résultats
Les modalités de la communication du résultat du test rapide d'orientation diagnostique au patient
Le ou les laboratoires de biologie médicale identifiés pour la réalisation du diagnostic biologique de l'infection à VIH-1 et 2 mentionné à l'article 1 ^{er}
Les modalités de la prise en charge du patient en cas de positivité du test rapide d'orientation diagnostique

Dans ce premier arrêté, l'utilisation des TROD revêt donc un caractère tout à fait exceptionnel, réservé aux contextes d'urgence.

Arrêté du 9 novembre 2010 fixant les conditions de réalisation des tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et 2) [8].

L'arrêté du 9 novembre 2010 reprend les situations d'urgence énoncées dans celui du 28 mai 2010 et élargit l'utilisation des TROD VIH à des situations ne nécessitant pas de dépistage en urgence pour « toute personne, dans son intérêt et pour son seul bénéfice, après l'avoir informée et avoir recueilli son consentement libre et éclairé ». Ce test pourra être réalisé comme précédemment par un médecin exerçant en cabinet, un médecin, un biologiste médical, une sage-femme exerçant dans un établissement ou un service de santé, un infirmier ou un technicien de laboratoire exerçant dans un établissement ou un service de santé, sous la responsabilité d'un médecin ou d'un biologiste médical, mais également par « un médecin, un biologiste médical, une sage-femme ou un infirmier intervenant dans une structure de prévention ou une structure associative impliquée en matière de prévention sanitaire » et « un salarié ou un bénévole, non professionnel de santé, intervenant dans une structure de prévention ou une structure associative ». Toute structure souhaitant mettre en place ce dispositif devra conclure une convention d'habilitation avec le directeur général de l'agence régionale de santé territorialement compétente. Celle-ci comprendra un cahier des charges dont les principaux points sont présentés dans le Tableau 3 et sera valide durant trois ans. Si la mise en œuvre de cette offre de dépistage ne se

Tableau 3 Éléments du cahier des charges relatif à l'habilitation des structures de prévention ou associatives impliquées en matière de prévention sanitaire pour l'utilisation des tests rapides d'orientation diagnostique VIH [8].

Objectifs de l'offre de dépistage par tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à VIH-1 et 2
Publics concernés
Structures pouvant être habilitées par voie conventionnelle par l'agence régionale de santé (ARS)
Personnel exerçant ou intervenant dans ces structures (personnes salariées ou les personnes bénévoles ayant suivi la formation à l'utilisation de ces tests rapides et disposant de l'attestation de suivi de cette formation)
Locaux et lieux d'intervention
Recommandations de bonnes pratiques
Confidentialité
Règles d'utilisation des réactifs servant au test rapide d'orientation diagnostique de l'infection à VIH
Articulation avec le réseau de prise en charge
Règles d'hygiène et d'élimination des déchets
Procédure d'assurance qualité
Évaluation de l'activité de réalisation des tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à VIH-1 et 2 par la structure

fait pas dans l'année suivant la signature de la convention, celle-ci devient caduque.

Les objectifs de cet arrêté sont en ligne avec ceux du plan national de lutte contre le VIH/Sida et les IST 2010 à 2014 pour un renforcement et un élargissement de l'offre de dépistage de l'infection à VIH [6].

Principe technologique des TROD VIH

Les TROD VIH ayant le marquage CE détectent les anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 (Tableau 4). Seule la trousse Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo détecte également l'antigène p24 de façon simultanée et différenciée dans une seconde fenêtre de lecture. Pour la détection des anticorps, des protéines recombinantes ou des peptides de synthèse dérivés de protéines de VIH-1 (gp41, gp120 ou p24) et de VIH-2 (gp36) sont utilisés préférentiellement. Parfois, des peptides spécifiques du VIH-1 groupe O (VIH-1 O) sont ajoutés pour gagner en sensibilité de détection pour les souches de ce groupe antigéniquement assez éloignées de celles du groupe M du VIH-1. Certaines trousses permettent la discrimination entre une infection par du VIH-1 et celle par du VIH-2. Cependant, la capacité de différenciation est très variable selon les tests. Pour la grande majorité des trousses, c'est l'immunochromatographie avec flux latéral qui est la technologie de choix. Le résultat est obtenu rapidement, de cinq à 35 minutes.

Les premiers TROD étaient destinés à une utilisation sur sérum ou plasma, ce qui apportait une contrainte importante en termes de praticabilité car ils nécessitaient une ponction de sang veineux et une centrifugation de l'échantillon prélevé. Grâce aux évolutions technologiques, les fabricants ont développé de nouvelles trousses

fonctionnant sur d'autres matrices tels le sang total capillaire, la salive (fluide oral) ou les urines. Comme nous le verrons plus loin, les performances sont alors inférieures. En France, seuls le sérum, le plasma ou le sang total peuvent être utilisés, et aucun test urinaire n'a obtenu, à ce jour, de marquage CE.

Performances des TROD VIH

Afin de mieux comprendre quelles sont les limites des TROD, quelques rappels sur l'évolution des marqueurs virologiques au cours de l'histoire naturelle de l'infection à VIH sont nécessaires. Après pénétration dans l'organisme, le VIH-1 infecte les premières cellules cibles présentes sur le lieu d'entrée (cellules présentatrices d'antigène) au bout d'environ quatre heures et s'y multiplie. Il gagne ensuite les ganglions lymphatiques locaux où il infecte les LTCD4+ après deux jours. Le virus va alors diffuser dans l'organisme par voies lymphatique et sanguine. Cette primo-infection s'accompagne de la multiplication exponentielle du virus contre lequel l'organisme est immunitairement naïf et que l'on peut visualiser par la mesure de la charge virale (Fig. 1). Après une fenêtre virologique d'une semaine environ après la contamination durant laquelle aucun marqueur virologique ne peut être mis en évidence dans le sang, on pourra observer un pic de charge virale s'élevant parfois à plusieurs millions de copies de génome viral par millilitre de plasma. À deux semaines environ postcontamination, l'antigène p24, protéine de capsid, pourra être mis en évidence dans le sérum. Sa présence sera fugace. Ce n'est qu'au bout de trois semaines, durée de la fenêtre sérologique, que l'on pourra détecter des anticorps anti-VIH-1 dans le sérum. Comme nous l'avons vu, la spécificité d'un test de dépistage positif doit être confirmée par un test de confirmation selon des critères de positivité précis qui ne seront présents qu'à partir de quatre semaines postcontamination.

Jusqu'à la parution des arrêtés sur le diagnostic en 2010, les outils du dépistage VIH en France comprenaient les tests Elisa mixtes détectant les anticorps anti-VIH-1 et VIH-2, les trousses Elisa combinées détectant l'antigène p24 et les anticorps anti-VIH-1 et VIH-2, et les TROD détectant les anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 (TROD anticorps). Au-delà de la législation en vigueur à cette période, beaucoup de biologistes avaient choisi de faire le dépistage avec un test Elisa mixte couplé à un test Elisa combiné afin d'accroître la sensibilité pour les sujets qui auraient été dans la fenêtre sérologique. Costagliola et al. ont publié en 2008 les résultats d'une étude indiquant le bénéfice de la réalisation d'un seul test Elisa combiné par rapport à deux tests l'un mixte et l'autre combiné [11]. Les autorités de santé sont allées dans ce sens avec le passage de deux tests à un pour le dépistage.

Depuis 2010, seuls les trousses Elisa combiné et les TROD peuvent être utilisés pour le dépistage. Cependant, il est important d'avoir à l'esprit que des différences importantes en termes de performances existent, d'une part, entre les différentes catégories de trousses, et, d'autre part, à l'intérieur de chaque catégorie. Sur la Fig. 1 est présentée la chronologie de positivité des différents types de tests de dépistage lors de la primo-infection par du VIH-1, ce qui permet de visualiser le bénéfice de l'utilisation des trousses combinées dans ce cadre et le

Tableau 4 Caractéristiques des trousses rapides d'orientation diagnostique commercialisées en France.

Trousse	Fabricant/Distributeur	Principe	Antigènes utilisés	Matrice	Lecture après (minutes)
Core™ HIV-1&2	Core Diagnostics	Flux latéral	Gp41 ^a , p24 ^a combinée à VIH-1 O ^b , gp36 ^a	S, P, ST	Min 15 – max 30
Determine™ HIV-1/2	Alere	Flux latéral	Non précisé sur la notice	S, P, ST	Min 15 – max 60
Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo	Alere	Flux latéral	Non précisé sur la notice	S, P, ST	Min 15 – max 30
Genie™ Fast HIV-1/2	Biorad Laboratories	Flux latéral	Gp120 ^a , gp41 ^a , gp36 ^a	S, P, ST	Min 10 – max 30
ImmunoComb® HIV-1&2 BiSpot	Alere	EIA phase solide, différenciation 1/2	Gp120 ^b , gp41 ^b , gp36 ^b	S, P	Immédiate après réalisation du test (35)
ImmunoFlow HIV-1/HIV-2	Core Diagnostics / Fumouze	Flux latéral, différenciation 1/2	Gp120, gp41, VIH-1 O ^b , gp36 ^b	S	Min 15 – max 30
INSTI™ HIV-1/HIV-2 Antibody Test	Biolytical/Nephrotek	Immunofiltration	Gp41 ^a , gp36 ^a	S, P, ST	Immédiate après réalisation du test (5)
OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test	Orasure/Meridian Bioscience europe	Flux latéral	Gp41 ^a , gp36 ^a	S, P, ST	Min 20 – max 40
Retrocheck® HIV	Qualpro Diagnostics / All.diag	Flux latéral	Gp41 ^a , p24 ^a combinée à VIH-1 O ^b , gp36 ^a	S, P, ST	Min 15 – max 30
RetroScreen® HIV	Qualpro Diagnostics / All.diag	Flux latéral, différenciation 1/2	Gp120, gp41, VIH-1 O ^b , gp36 ^b	S	Min 15 – max 30
SD Biotline HIV-1/2 3.0	Alere	Flux latéral, différenciation 1/2	Gp41 ^a , p24 ^a , gp36 ^a	S, P, ST	Min 5 – max 20
VIKIA™ HIV-1/2	Biomérieux	Flux latéral	Gp41 ^b , VIH-1 M et O, gp36 ^b	S, P, ST	30 si négatif, avant si positif

S: serum; P: plasma; ST: sang total; EIA: *enzyme immunosorbent assay*.^a Protéines recombinantes.^b Peptides de synthèse.

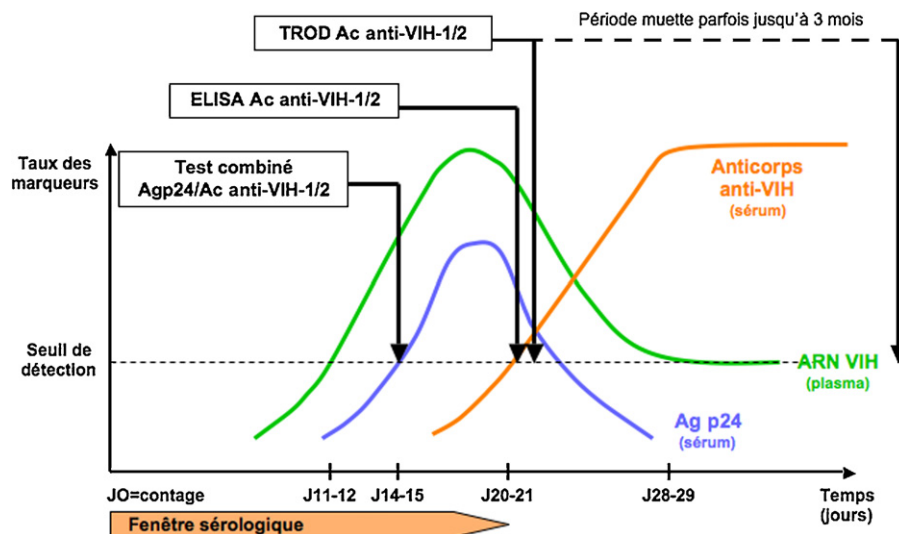


Figure 1 Évolution de marqueurs virologiques au cours de la primo-infection par du VIH-1, en l'absence de traitement antirétroviral, et chronologie de positivité des tests de dépistage.

manque de sensibilité évidente des TROD anticorps. Pour illustrer cela, je m'appuierai en premier lieu sur une étude que nous avons réalisée dans le laboratoire entre le 1^{er} juillet 2006 et le 9 avril 2008. Sur cette période, nous avons analysé 1288 sérums à l'aide des trousses Determine™ HIV-1/2 (Alere, TROD), Genscreen® Ultra HIV Ag/Ab (Laboratoires Biorad, Elisa combiné) et HIV-1/2 Ag/Ab Architect® combo (Laboratoires ABBOTT, Elisa combiné). Trente-huit sérums provenaient de sujets infectés (2,95 % des analysés) dont quatre en primo-infection (10,5 % des infectés et 0,3 % des analysés). Le test Determine™ HIV-1/2 a détecté 37 infections sur 38, soit une sensibilité de 97,37 % par rapport aux Elisa combinés qui étaient tous deux positifs. Le sérum trouvé négatif en Determine™ HIV-1/2 provenait d'un patient en primo-infection VIH-1.

Laforgerie et al. [12] ont publié, en 2010, une étude dans laquelle ils ont analysé la sensibilité de huit TROD anticorps sur des panels commerciaux de plasmas de séro-conversion, et sur des échantillons sériques de 94 sujets infectés par du VIH-1 de différents groupes (VIH-1 groupes M et O) et sous-types pour le VIH-1 groupe M (B, non-B et formes recombinantes circulantes) et du VIH-2, au stade chronique de l'infection. Un résultat négatif a été obtenu avec un certain nombre de trousses dont Determine™ HIV-1/2, DoubleCheck™ II HIV-1&2, ImmunoComb® HIV-1&2 BiSpot, INSTI™ HIV-1/HIV-2 Antibody Test, et VIKIA™ HIV-1/2. De même, Patel et al. [13] ont analysé la sensibilité des TROD Multispot HIV-1/HIV-2, Clearview Complete®, Clearview HIV-1/2 Statpak® et Unigold Recombigen® distribués aux États-Unis, ainsi qu'Oraquick Advanced Rapid HIV-1/2® Antibody Test et Determine™ HIV Ag/Ac Combo également marqués CE, sur des plasmas positifs pour la détection de l'ARN du VIH-1 provenant de sujets en primo-infection. Les trousses Genetic System HIV-1/2 + O® (Elisa mixte) et Architect HIV Ag/Ab Combo® (Elisa combiné) étaient testées en parallèle. Les meilleures sensibilités ont été obtenues à l'aide des trousses combinées Architect HIV Ag/Ab Combo® (87,8 %) et Determine™ HIV Ag/Ac Combo (75,8 %). Les trousses détectant uniquement les anticorps

avaient des résultats très médiocres entre 21,9 % (Oraquick Advanced Rapid HIV-1/2® Antibody Test) et 33,3 % (Multispot HIV-1/HIV-2) pour les TROD et de 57,5 % pour Genetic System HIV-1/2 + O®.

La sensibilité de détection de l'antigène p24 de la trousse Determine™ HIV Ag/Ac Combo a été analysée par rapport à la trousse Vironostika HIV-1 antigène Elisa et à la mesure de la charge virale par Kilembe et al. [14]. Parmi 34 échantillons plasmatiques contenant entre 6,2 et 7,2 Log₁₀ copies/mL (médiane = 6,8) d'ARN génomique de VIH-1, et positifs pour la détection de l'antigène p24 avec la trousse Vironostika HIV-1 antigène Elisa, Determine™ HIV Ag/Ac Combo était négatif pour la détection de l'antigène p24 et des anticorps anti-VIH-1/2 pour 26, positif pour l'antigène p24 uniquement pour un et positif pour les anticorps anti-VIH-1/2 pour sept. Vingt-neuf des 34 échantillons provenaient de sujets infectés par du VIH-1 sous-type C. Les résultats obtenus par Rosenberg et al. ont confirmé le manque de sensibilité de ce test pour la détection de l'antigène p24 [15].

Ces résultats indiquent clairement les limites de performances de la détection d'une primo-infection par du VIH-1 par un TROD même combiné. Or, la capacité des trousses à mettre en évidence une infection récente est très importante car, un patient à ce stade de l'infection a 26 fois plus de risques de contaminer un partenaire que s'il est au stade chronique de l'infection [4].

Au-delà de la problématique du dépistage VIH chez un sujet en primo-infection, les TROD ont une sensibilité diminuée pour la détection des anticorps dirigés contre certaines souches de VIH-1 groupe O alors même que les patients sont au stade chronique de l'infection. Ainsi, en 2008, nous avons étudié la réactivité de cinq TROD sur 12 sérums de sujets infectés par du VIH-1 O au stade chronique de l'infection [16]. Les trousses Determine™ HIV-1/2, ImmunoComb® HIV-1&2 BiSpot et SD Bioline HIV-1/2 3.0 étaient toujours positives mais avec une intensité de réaction à la limite de la visibilité pour certains échantillons (de un à quatre selon la trousse considérée). En revanche, les trousses Immunoflow

HIV-1/HIV-2 et Retrocheck® ont manqué la détection pour un et trois échantillons, respectivement.

La spécificité des TROD est également plus faible que celle observée avec les trousse Elisa mixtes ou combinées. Dans l'étude menée au laboratoire, la spécificité était de 98,80 % pour Determine™ HIV-1/2, 99,67 % pour Genscreen Ultra HIV Ag/Ab et 99,64 % pour HIV-1/2 Ag/Ab Architect® combo.

La plupart des trousse développées récemment peuvent être utilisées sur de nouvelles matrices tel que le sang total capillaire ou le fluide oral (frottis de gencives et de la muqueuse buccale). Cependant, plusieurs études indiquent que leur sensibilité sur ces nouveaux milieux biologiques est alors nettement diminuée. Ainsi, Pavie et al. [17] ont analysé la sensibilité de cinq TROD VIH sur sang total capillaire (Determine™ HIV-1/2, Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo, INSTI™ HIV-1/HIV-2 Antibody Test, VIKIA™ HIV-1/2, OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test) ou sur fluide oral (OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test) chez 200 patients infectés par du VIH-1 ($n=194$) ou du VIH-2 ($n=6$). Pour le sang capillaire, les sensibilités étaient variables et parfois très mauvaises : 94,5 % pour OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test, 94,9 % pour Determine™ HIV-1/2, 95,8 % pour Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo, 98,5 % pour VIKIA™ HIV-1/2 et 99 % pour INSTI™ HIV-1/HIV-2 Antibody Test. Les patients trouvés négatifs ont été testés sur sérum ; les résultats étaient tous positifs pour VIKIA™ HIV-1/2, Determine™ HIV-1/2 et Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo, indiquant une sensibilité bien supérieure sur sérum que sur sang capillaire. Par ailleurs, le sang total étant assez épais, un grand nombre de résultats invalides (absence de la bande contrôle validant le test située en fin de migration pour les tests immunochromatographiques) a été observé avec la trousse Determine™ HIV-1/2 Ag/Ac Combo (16,5 %) et dans une moindre mesure pour les trousse Determine™ HIV-1/2 (2 %) et INSTI™ HIV-1/HIV-2 Antibody Test (1 %). De même, sur fluide oral, la sensibilité de la trousse Quick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test n'était que de 86,5 %. Dans ce sens, Huguin et al. ont comparé les performances de la trousse OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test sur fluide oral, sérum ou plasma de patients infectés par différents sous-types de VIH-1 et formes recombinantes circulantes [18]. Les patients se trouvaient au stade chronique de l'infection. Tous les sérums et plasmas étaient positifs alors que trois fluides oraux sur 139 étaient négatifs, conduisant à une sensibilité de 97,84 %. Les tests négatifs correspondaient à un VIH-1 sous-type B d'une part, et à deux sous-types D, d'autre part.

Allant de pair avec la baisse de sensibilité, la réalisation de tests sur sang total capillaire induit une baisse de la spécificité. Kroidl et al. ont évalué les performances du test Determine™ HIV-1/2 sur plasma et sang total, en parallèle, dans une cohorte de 15 000 sujets [19]. Dans le sang total, 67,1 % des échantillons trouvés positifs l'étaient faussement (valeur prédictive positive = 32,91 %) alors qu'ils n'étaient que 17,4 % dans le plasma (valeur prédictive positive = 82,57 %).

Avantages et inconvénients des TROD

Le principal avantage des TROD est la possibilité de leur utilisation sur le terrain, en dehors d'un laboratoire de biologie

médicale (Tableau 5) [20–23]. C'est un avantage majeur pour pouvoir aller vers des populations qui ne souhaitent ou ne peuvent pas avoir recours aux structures classiques du dépistage, ou ignorent leur existence. Dans les pays du Sud où il n'est pas possible de mettre en place des méthodes de dépistage classiques de type Elisa et des tests de confirmation par manque de moyens financiers, d'électricité, de chaîne du froid et de formation, les TROD sont souvent les seuls tests disponibles. Des algorithmes combinant deux ou trois tests, les premiers choisis pour leur sensibilité et les suivants pour leur spécificité, permettent d'orienter vers un diagnostic d'infection à VIH [24]. Dans les pays industrialisés, le recours aux TROD concerne principalement des sujets migrants, des HSH, des personnes sans papier ou des prostituées. Dès 2005, les autorités suisses ont contribué à l'ouverture, à Genève, du premier « Checkpoint », structure d'accueil et d'écoute des HSH au départ, puis d'autres publics à partir de 2007 [25]. Les personnes viennent de façon anonyme pour discuter, faire des tests pour le VIH (rapides ou Elisa combiné selon le contexte), les virus des hépatites B et C ou la syphilis. Cette structure connaît un succès grandissant car elle propose une prise en charge globale de la santé d'un sujet sans cibler sur le VIH, avec une liberté d'accès et de discussion.

La faisabilité et l'intérêt d'un dépistage VIH généralisé dans les services d'urgence hospitaliers ont été explorés au cours de différentes études [26–28]. Ainsi, en France, D'Almeida et al. ont analysé la faisabilité et l'impact en termes de santé publique d'une proposition de dépistage par TROD sur sang capillaire chez tous les patients éligibles à l'étude, entre 18 et 64 ans, se présentant aux urgences adultes de 29 établissements hospitaliers d'Île-de-France sur une période de six semaines [9]. Il en ressort que ce type de dépistage est réalisable, mais qu'il serait plus efficace s'il était pratiqué de façon ciblée sur des populations à forte séroprévalence. Une seconde étude, ANRS URDEP réalisée aux urgences de six hôpitaux parisiens sur une période d'une année dans chaque site, a conclu au coût-efficacité de ce type de démarche [29].

D'autres lieux de dépistage par TROD ont été proposés avec en particulier les prisons [30], les centres d'information, de dépistage anonyme et gratuit (CIDAG) avec l'étude ANRS DRAG-TEST lancée en France en 2010.

La rapidité de rendu du résultat et la simplicité de réalisation constituent les deux autres avantages majeurs des TROD.

À côté de ces avantages, certains inconvénients peuvent être pointés (Tableau 5). En premier lieu, comme nous l'avons vu précédemment, les performances analytiques des TROD sont limitées avec une sensibilité et une spécificité inférieures à celles des tests Elisa combinés, et une large variabilité des performances selon la matrice choisie (sang total, plasma, sérum, fluide oral). La lecture du résultat se fait uniquement de façon visuelle, ce qui entraîne une subjectivité importante. Selon l'acuité visuelle et la capacité d'un sujet à distinguer les couleurs, le résultat pourra être interprété de façon variable, en particulier dans le cas où le signal sera faible. Comme nous l'avons évoqué lors de la présentation des performances des TROD, ce cas se rencontre non seulement au cours d'une primo-infection mais également pour des sujets au stade chronique. Allant contre une démarche d'assurance qualité, le résultat obtenu avec

Tableau 5 Principaux avantages et inconvénients des tests rapides d'orientation diagnostique VIH.

Avantages	Inconvénients
Délocalisation : test réalisable sur le terrain en dehors d'un laboratoire de biologie médicale	Performances analytiques limitées : sensibilité et spécificité inférieures à celles des tests Elisa combinés, variabilité des performances selon la matrice choisie (sang total, plasma, sérum, fluide oral)
Rapidité : lecture du test immédiate à 30 minutes après sa réalisation (possible parfois jusqu'à 60 minutes)	Subjectivité : lecture visuelle
Simplicité : pas de matériel sophistiqué, pas d'électricité requise, nombre d'étapes limité	Manque de traçabilité du résultat
Stockage à température ambiante	Ne teste que le VIH. Peu adapté à des populations avec une forte prévalence de l'infection par les virus des hépatites B et C
Différenciation VIH-1/VIH-2 pour certains tests	Simplicité pouvant faire oublier les limites techniques du test
	Contrôle de la production et de la distribution
	Coût élevé

un TROD manque de traçabilité. Cela peut être corrigé par la prise de photo ou la réalisation d'un scan permettant un archivage et une vérification ultérieure du résultat. Il serait important que les fabricants de réactifs proposent l'automatisation de la lecture.

Les TROD actuellement commercialisés en France ne permettent de détecter que l'infection par le VIH mais pas celle par les virus des hépatites B et C de façon conjointe. Or, pour certaines populations chez lesquelles les TROD seraient indiqués, la prévalence des infections chroniques à VHB est importante et les médecins préfèrent avoir recours à une ponction veineuse pour pouvoir rechercher l'ensemble des marqueurs d'intérêt. En pratique, certaines équipes font le choix de faire plusieurs TROD, l'un pour le VIH, l'autre pour le VHB. Une détection conjointe, sur le même test, de différents marqueurs d'infection permettrait de faciliter le dépistage. Seule la trousse Core™ Combo HIV-HBsAg-HCV (Core diagnostics) permet la détection simultanée des anticorps anti-VIH-1/VIH-2, anti-VHC et de l'antigène HBs du VHB dans le sang total. Or, cette trousse n'a pas de marquage CE.

La grande facilité de réalisation des TROD tend à faire oublier les limites de leurs performances analytiques et il est essentiel de les rappeler à la personne à laquelle le résultat est rendu, comme précisé dans l'arrêté du 9 novembre 2010. Quel que soit le résultat, négatif ou positif, un commentaire objectif et précis devra être donné à la personne au cours d'un entretien post-test. De même, compte tenu du délai très court entre la réalisation du test et le rendu de son résultat, certains patients se sont plaints de ne pas avoir le temps de se préparer à l'annonce d'un test éventuellement positif.

La faible transparence dans le contrôle de la production et de la distribution dans certaines zones géographiques est également un inconvénient. Des expériences africaines indiquent une variabilité des performances au cours du temps selon les lots et l'approvisionnement. Les TROD se conservent en général à température ambiante jusqu'à 30 °C, mais très peu d'études sont disponibles sur leur thermostabilité dans des zones où la température peut dépasser les 40 °C durant plusieurs mois. Après développement d'une nouvelle trousse, les fabricants transfèrent parfois la production et les brevets vers des fabricants qui n'ont pas le

même niveau d'exigence en termes de qualité de production et de contrôle. Afin de maintenir un niveau optimal de qualité, il sera important que les utilisateurs non biologistes, qui ne sont pas formés aux procédures qualité pour les réactifs comme le sont les biologistes, soient sensibilisés à la réactovigilance.

Enfin, le coût élevé des TROD, de 1,20 à 15 euros HT, par rapport aux tests sur microplaques ou automates fermés peut être un frein à leur utilisation élargie.

Conclusion et perspectives

Comme nous l'avons vu, les arrêtés des 28 mai et 9 novembre 2010 ont ouvert l'utilisation des TROD pour les cas d'urgence dans un milieu de soin hospitalier ou au cabinet du médecin de ville, mais également de façon plus générale dans des structures de prévention ou associatives. Le but est d'élargir l'offre de dépistage pour permettre à des personnes qui ignorent leur infection d'être dépistées, et ainsi de pouvoir bénéficier d'une prise en charge précoce, clairement associée à une augmentation des chances de survie et à une diminution de la morbidité, et de permettre de lutter contre la diffusion du virus dans la population.

À ce jour, seuls le sang total, le sérum ou le plasma sont autorisés pour effectuer les tests. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé le 3 juillet dernier la libre commercialisation comme auto test, sans supervision médicale, de la trousse OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test sur fluide oral, sous le nom de OraQuick In-Home HIV [31]. Les études cliniques avaient pourtant mis en évidence des performances médiocres avec une sensibilité estimée à 92 %. En France, le Conseil national du sida avait émis en 2008 un avis réservé quant à l'utilisation d'auto tests car celle-ci maintient les personnes dans un isolement, ne permettant aucun échange avec un professionnel de santé ou un membre associatif pour pouvoir discuter et pour pouvoir faire le lien avec une structure de soin [32].

Déclaration d'intérêts

Interventions ponctuelles : rapports d'expertise pour Alere, Biolytical, Laboratoires Biorad, Core Diagnostics.

Conférences : invitations en qualité d'intervenant pour les laboratoires Biorad.

Remerciements

L'auteur remercie chaleureusement le Professeur J.-M. Huraux pour ses échanges très constructifs autour des TROD.

Références

- [1] Arrêté du 28 avril 2003 fixant les conditions particulières d'évaluation et d'utilisation des réactifs de dépistage et de confirmation des anticorps anti-VIH 1 et 2 et des anticorps anti-HTLV I et II paru au Jorf n° 110 du 13 mai 2003 : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00000603362&dateTexte=&categorieLien=id>
- [2] Le Vu S, Le Strat Y, Barin F, Pillonel J, Cazein F, Bousquet V, et al. Population-based HIV-1 incidence in France, 2003–08: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:682–7.
- [3] Cazein F, Le Strat Y, Pillonel J, Lot F, Bousquet V, Pinget R, et al. Dépistage du VIH et découvertes de séropositivité, France, 2003–2010. *Bull Epidemiol Hebd* 2011;43–44:446–53.
- [4] Yéni P. Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH. Recommandations du groupe d'experts. Rapport 2010. Paris: La Documentation française; 2010 [p. 1–417].
- [5] Hasse B, Ledergerber B, Furrer H, Battegay M, Hirschel B, Cavassini M, et al. Morbidity and aging in HIV-infected persons: the Swiss HIV cohort study. *Clin Infect Dis* 2011;53:1130–9.
- [6] Plan national de lutte contre le VIH/Sida et les IST 2010–2014. Paris : Ministère de la santé et des sports; 2010. p. 1–266. Disponible à : http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/plan_national_lutte_contre_le_VIH-Sida_et_les_IST_2010-2014.pdf
- [7] Arrêté du 28 mai 2010 fixant les conditions de réalisation du diagnostic biologique de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (VIH 1 et 2) et les conditions de réalisation du test rapide d'orientation diagnostique dans les situations d'urgence, paru au Jorf n° 31 du 9 juin 2010 : <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022320859&dateTexte=&categorieLien=id>
- [8] Arrêté du 9 novembre 2010 fixant les conditions de réalisation des tests rapides d'orientation diagnostique de l'infection à virus de l'immunodéficience humaine, (VIH 1 et 2), paru au Jorf n° 19 du 17 novembre 2010, <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=B9688ECB8D080FDB2512337119554C2A.tpdjo3v.2?cidTexte=JORFTEXT000023093746&categorieLien=id>
- [9] D'Almeida KW, Kierzek G, de Truchis P, Le Vu S, Pateron D, Renaud B, et al. Modest public health impact of nontargeted human immunodeficiency virus screening in 29 emergency departments. *Arch Intern Med* 2011;172:12–20.
- [10] Décision de la commission du 3 février 2009 modifiant la décision 2002/364/CE portant spécifications techniques communes des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (2009/108/CE), parue au JOR L39/34 du 10 février 2009 : <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:039:0034:0049:FR:PDF>
- [11] Costagliola D, Damond F, Palmer P, Rouzioux C, Brun-Vezinet F. One or two enzyme-linked immunosorbent assay tests on the first serum sample for initial diagnosis of HIV-1 infection? *AIDS* 2008;22:2042–4.
- [12] Laforgerie E, Boucher B, Ly TD, Maisonneuve L, Izopet J, Delaugerre C, et al. Sensitivity of 8CE (European Community)-approved rapid disposable tests for anti-HIV antibody detection during and after seroconversion. *J Virol Methods* 2010;165:105–7.
- [13] Patel P, Bennett B, Sullivan T, Parker MM, Heffelfinger JD, Sullivan PS. Rapid HIV screening: missed opportunities for HIV diagnosis and prevention. *J Clin Virol* 2012;54:42–7.
- [14] Kilembe W, Keeling M, Karita E, Lakhi S, Chetty P, Price MA, et al. Failure of a novel, rapid antigen and antibody combination test to detect antigen-positive HIV infection in African adults with early HIV infection. *PLoS One* 2012;7:e37154.
- [15] Rosenberg NE, Kamanga G, Phiri S, Nsona D, Pettifor A, Rutstein SE, et al. Detection of acute HIV infection: a field evaluation of the determine(R) HIV-1/2 Ag/Ab combo test. *J Infect Dis* 2012;205:528–34.
- [16] Gautheret-Dejean A, Mesmin-Poho S, Birguel J, Lemee V, Huraux JM, Plantier JC. Unequal detection of HIV type 1 group O infection by simple rapid tests. *Clin Infect Dis* 2008;46:1936–7.
- [17] Pavie J, Rachline A, Loze B, Niedbalski L, Delaugerre C, Laforgerie E, et al. Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood: a real-time comparison in a health-care setting. *PLoS One* 2010;5:e11581.
- [18] Holguin A, Gutierrez M, Portocarrero N, Rivas P, Baquero M. Performance of OraQuick Advance Rapid HIV-1/2 Antibody Test for detection of antibodies in oral fluid and serum/plasma in HIV-1+ subjects carrying different HIV-1 subtypes and recombinant variants. *J Clin Virol* 2009;45:150–2.
- [19] Kroidl I, Clowes P, Mwalongo W, Maganga L, Maboko L, Kroidl AL, et al. Low specificity of determine HIV1/2 RDT using whole blood in South West Tanzania. *PLoS One* 2012;7:e39529.
- [20] Greenwald JL. Routine rapid HIV testing in hospitals: another opportunity for hospitalists to improve care. *J Hosp Med* 2006;1:106–12.
- [21] Pai NP, Tulskey JP, Cohan D, Colford Jr JM, Reingold AL. Rapid point-of-care HIV testing in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health* 2007;12:162–73.
- [22] Everett DB, Baisley K, Changalucha J, Valley A, Watson-Jones D, Cook C, et al. Suitability of simple human immunodeficiency virus rapid tests in clinical trials in community-based clinic settings. *J Clin Microbiol* 2009;47:1058–62.
- [23] Blyth CC, Booy R, Dwyer DE. Point of care testing: diagnosis outside the virology laboratory. *Methods Mol Biol* 2011;665:415–33.
- [24] Klarkowski DB, Wazome JM, Lokuge KM, Shanks L, Mills CF, O'Brien DP. The evaluation of a rapid in situ HIV confirmation test in a programme with a high failure rate of the WHO HIV two-test diagnostic algorithm. *PLoS One* 2009;4:e4351.
- [25] Gumy C, Jeannin A, Balthasar H, Huissoud T, Jobin V, Hausermann M, et al. Five-year monitoring of a gay-friendly voluntary counselling and testing facility in Switzerland: who got tested and why? *BMC Public Health* 2012;12:422.
- [26] Burns F, Edwards SG, Woods J, Haidari G, Calderon Y, Leider J, et al. Acceptability and feasibility of universal offer of rapid point of care testing for HIV in an acute admissions unit: results of the RAPID project. *PLoS One* 2012;7:e35212.
- [27] Jain S, Lowman ES, Kessler A, Harper J, Rumoro DP, Smith KY, et al. Testing in a large urban emergency department. *J Emerg Med* 2012 [publication électronique avant impression].
- [28] Haukoos JS, Hopkins E, Bender B, Al-Tayyib A, Long J, Harvey J, et al. Use of kiosks and patient understanding of opt-out and opt-in consent for routine rapid human immunodeficiency virus screening in the emergency department. *Acad Emerg Med* 2012;19:287–93.
- [29] Casalino E, Bernot B, Bouchaud O, Alloui C, Choquet C, Bouvet E, et al. Twelve months of routine HIV screening in 6 emergency departments in the Paris area: results from the ANRS URDEP study. *PLoS One* 2012;7(10):e46437.
- [30] Beckwith CG, Nunn A, Baucum S, Getachew A, Akinwumi A, Herdman B, et al. Rapid HIV testing in large urban jails. *Am J Public Health* 2012;102(2):S184–6.

[31] Approval Letter, OraQuick In-Home HIV Test, du 3 juillet 2012. Food and Drug Administration 2012: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/PremarketApprovalsPMAs/ucm310592.htm>

[32] Dépistage et auto test : une fausse bonne idée. Communiqué de presse du 1^{er} décembre 2008. Conseil national du Sida 2008 : http://www.cns.sante.fr/IMG/pdf/CP_Depistage_et_autotests.pdf



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Valeur sémiologique d'une hypercalcitoninémie

Semiologic value of a high calcitonin level

M. d'Herbomez*

Université de Lille II, 59037 Lille cedex, France

Reçu le 10 août 2012 ; accepté le 19 novembre 2012

KEYWORDS

Calcitonin;
Medullary thyroid
cancer;
Assay

MOTS CLÉS

Calcitonine ;
Cancer médullaire de
la thyroïde ;
Dosage

Summary Calcitonin is the sensitive and specific marker of the medullary thyroid cancers. It is a diagnostic, prognostic and follow-up marker. Medullary thyroid cancer is a rare disease representing 4% of the thyroid cancers and occurring in 0.4% of nodular thyroid pathology. The use of sex specific adults normal ranges allows a better interpretation of the moderately elevated calcitonin levels. Hypercalcitoninaemia non due to medullary thyroid cancer are attributed mainly to male sex, tobacco use, overweight, renal failure, and other endocrine tumors. Calcitonin can be assayed in the wash-out fluid of the fine needle aspiration too. Stimulation tests give poor additional diagnostic information and are about to be abandoned.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé La calcitonine sérique est le marqueur sensible et spécifique des cancers médullaires de la thyroïde. C'est un marqueur diagnostique, pronostique et de suivi. Le cancer médullaire de la thyroïde est une pathologie rare : 4 % des cancers thyroïdiens avec une incidence en pathologie nodulaire thyroïdienne proche de 0,4 %. L'utilisation de normes adultes spécifiques par sexe permet une meilleure interprétation des élévations modérées de la calcitonine. Les principales causes d'hypercalcitoninémies non dues à des cancers médullaires de la thyroïde sont principalement le sexe masculin, le tabac, le surpoids, l'insuffisance rénale et la présence d'une autre tumeur neuroendocrine. La calcitonine peut être aussi dosée dans le liquide de rinçage des aiguilles de ponction. Les tests de stimulation n'apportent que peu d'informations supplémentaires et tendent à être abandonnés.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abréviations

CT calcitonine
bCT calcitoninémie basale

CMT cancer médullaire de la thyroïde
HCC hyperplasie des cellules C
NEM2A néoplasie endocrine multiple de type 2A
TNE tumeur neuro-endocrine
Ret *rearranged during transfection*
RECIST *response evaluation in solid tumors*

* Centre de biologie-pathologie-génétique, CHRU, 59037 Lille cedex, France.

Adresse e-mail : m-dherbomez@chru-lille.fr

Introduction

La CT mature est constituée de 32 acides aminés (AA). Un pont di-sulfure relie les cystéines en position 1 à 7 et forme un anneau à la partie N terminale. C'est le gène *Calc-1* situé sur le chromosome 11 qui code le précurseur appelé préprocalcitonine. Ce précurseur donnera naissance au peptide signal et à la procalcitonine (PCT 116 AA). La PCT se clivera en katalcalcine et CT immature puis en CT mature. Chez l'homme, les plus fortes concentrations de CT sont observées dans les cellules C thyroïdiennes. Des cellules C peuvent être aussi retrouvées dans les parathyroïdes, le thymus, les poumons, l'intestin grêle, la vessie et le foie.

La CT mature a une activité biologique sur la calcémie, la phosphatémie, l'os, le système nerveux central, la fonction respiratoire, l'appareil gastro-intestinal, le système reproductif et le rein. La sécrétion de CT est potentiellement régulée par les concentrations plasmatiques de calcium et de gastrine [1–3].

Dosages de la calcitonine

Prélèvements

Le dosage se réalise préférentiellement sur sérum à jeun. La CT ne possédant pas de rythme circadien peut être prélevée à tout moment de la journée mais à distance des repas pour éviter l'interférence potentielle de l'hypergastrinémie. La molécule de CT se dégrade rapidement à température ambiante, moins à 4°C. Il est donc impératif de congeler immédiatement les sérums. Elle peut supporter au moins trois cycles de congélation/décongélation [4,5].

Dosages

Les dosages les plus anciens ont été de type compétitif par utilisation d'anticorps polyclonaux. Les anticorps monoclonaux ont amélioré la sensibilité et la spécificité des dosages immunométriques actuels. Le premier anticorps de capture est fixé sur un support solide (tube ou cupule). Il est dirigé contre les séquences 11 à 17 ou 11 à 23 de la molécule. Le second dit de révélation, portant le marqueur, est dirigé contre les séquences 21 à 32 ou 26 à 32. Les traceurs peuvent être isotopique (^{125}I), enzymatique ou luminescent. Certains dosages sont automatisés. Tous se réfèrent à une courbe d'étalonnage. On mesure alors la bCT.

Artéfacts potentiels des dosages

Les dosages immunométriques, surtout ceux en une étape, peuvent être sujets à l'effet crochet. Des concentrations très élevées de CT, rencontrées chez des patients métastatiques, peuvent saturer le système de dosage et ainsi très fortement sous-estimer la concentration d'analyte. La mise en évidence de ce phénomène se fait par la réalisation de dilutions successives du prélèvement jusqu'à ramener la concentration évaluée dans la gamme de mesure [6].

L'interférence des anticorps hétérophiles donne de fausses élévations du marqueur (parfois plusieurs centaines de pg/mL). Les anticorps hétérophiles sont des

immunoglobulines (Ig) humaines anti-animales (souris par exemple). Ces IgG sont susceptibles de former des ponts entre les anticorps du dosage et mimer la présence de l'hormone. Pour réduire ce type d'interférence, tous les réactifs contiennent désormais un agent bloquant non spécifique de type sérum animal. Les interférences ne sont désormais observées que pour de rares patients présentant des titres anormalement élevés d'anticorps hétérophiles.

Tests de stimulation

Pendant de nombreuses années, des tests de stimulation de la CT par la pentagastrine ont été réalisés en complément des dosages de bCT. Ces tests de stimulation présentaient des effets secondaires tels que nausées, vomissements, rash cutané, douleurs d'estomac nécessitant ainsi une présence médicale lors de leur réalisation. Les soucis d'approvisionnement de ce produit (non commercialisé aux États-Unis) ont incité à l'utilisation du gluconate de calcium comme agent stimulant. Les conditions d'utilisation et d'interprétation, en pratique clinique, de ce produit ne sont pas réellement standardisées [7,8].

Dosage de calcitonine dans le liquide de rinçage de l'aiguille de ponction

Le diagnostic de CMT sur matériel de cytoponction des nodules thyroïdiens n'est réalisé que dans 63 % des cas. Des études récentes ont montré que des concentrations élevées de CT sont présentes dans le liquide de rinçage de l'aiguille de ponction de ganglions suspects ou de nodules thyroïdiens qui se révèlent être des CMT primitifs ou métastatiques [9]. Cette pratique se généralise. Le seuil de positivité n'est pas clairement défini mais une comparaison au taux sérique de CT permet une interprétation adéquate.

Association du dosage de calcitonine à d'autres marqueurs

L'antigène carcinoembryonnaire (ACE) est un marqueur non spécifique et moins fiable que la CT. Il peut être un marqueur de différenciation d'un CMT et, à ce titre, un marqueur de mauvais pronostic [10].

La PCT est potentiellement un autre marqueur de CMT avec des performances diagnostiques proches [5] ou un peu inférieures [11] à celle-ci. Le rapport PCT/CT est un facteur pronostique des CMT [11].

Valeurs de référence

Les valeurs de référence, éditées dans le livret de recommandations du Groupe des tumeurs endocrines (GTE), sont les suivantes : valeurs de référence de la bCT pour les trousseles Elisa-CT et IRMA hCT (Cis Bio-international France) sont inférieures à 10 pg/mL pour les adultes hommes et femmes.

Les valeurs de référence de bCT varient selon les méthodes de dosages. Contrairement à d'autres paramètres biologiques thyroïdiens, il n'a pas été édité de critères de sélection des sujets considérés comme témoins pour le

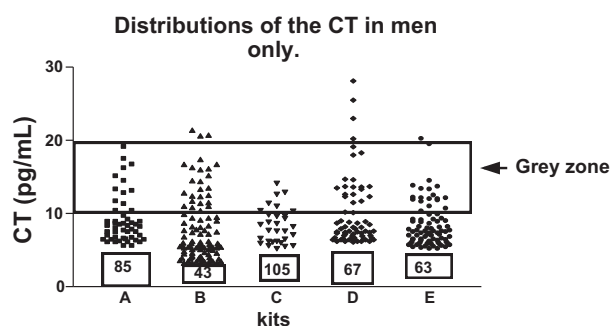


Figure 1 Distribution des valeurs de calcitonine sériques obtenues par cinq trousse de dosages différentes (A, B, C, D, E) pour des sujets contrôles hommes en euthyroïdie sans anticorps antithyroperoxydase circulants. Les nombres dans les rectangles correspondent aux taux de calcitonine indétectables.

D'après M. d'Herbomez et al. [15].

dosage de la bCT [12]. D'autres auteurs ont proposé des seuils mixtes (femmes et hommes) respectivement à 15 et 20 pg/mL [13,14].

Plusieurs études récentes [15,16] privilégient la dissociation des normes hommes et femmes en se basant sur les travaux autopsiques de Guyétant et al. [17] qui ont montré que globalement le contingent de cellules C chez l'homme est le double de celui de la femme. Les distributions des valeurs de CT obtenues chez des sujets contrôles par cinq trousse de dosages sont reportées sur les Fig. 1 et 2.

Chez les enfants âgés de moins de trois ans, les concentrations de CT sont plus élevées : inférieures à 40 pg/mL pour les nourrissons de moins de six mois et inférieures à 15 pg/mL entre six mois et trois ans [18].

Indications du dosage de calcitonine

Les principales indications du dosage de CT sérique sont regroupées dans le Tableau 1.

Dépistage du cancer médullaire de la thyroïde

Le CMT est un cancer rare qui se développe aux dépens des cellules C parafofolliculaires. Le CMT représente 4% des cancers thyroïdiens, son incidence en pathologie nodulaire

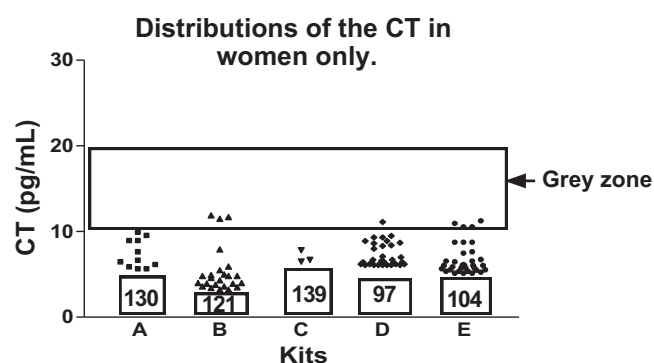


Figure 2 Distribution des valeurs de calcitonine sériques obtenues par cinq trousse de dosages différentes (A, B, C, D, E) pour des sujets contrôles femmes en euthyroïdie sans anticorps antithyroperoxydase circulants. Les nombres dans les rectangles correspondent aux taux de calcitonine indétectables.

D'après M. d'Herbomez et al. [15].

thyroïdienne est proche de 0,4%. Le CMT se développe de façon sporadique (70% des cas) et dans un contexte héréditaire (30%). Les affections héréditaires sont rattachées aux mutations germinales du proto-oncogène *RET*. La transmission est autosomique dominante. Dans les formes familiales, la première manifestation de l'atteinte pathologique des cellules C est leur hyperplasie (HCC). Cette HCC n'est pas spécifique des néoplasies endocrines multiples (NEM) de type 2, mais elle y est quasi constante, volontiers diffuse et bilatérale. Ces foyers d'HCC font le lit de microcancers, souvent bilatéraux. Dès le stade d'HCC, une élévation de la CT sérique est constatée [2,3,19–21]. Pour le CMT, il existe une relation linéaire entre le taux de CT et la masse tumorale [22].

Il est donc impératif de mesurer la CT dans un contexte héréditaire connu [2,3,19–21]. Pour certaines mutations classées comme étant à faible risque de progression (risque A), il est possible d'attendre l'élévation de la CT sérique pour programmer la thyroïdectomie totale [19].

Pour les patients opérés non guéris, le temps de doublement de la CT postopératoire est corrélé à la progression RECIST et à la survie [23,24]. Le dosage de CT, dans ce contexte, est couplé à celui d'ACE. La CT est bien un marqueur diagnostique et pronostique.

Diagnostic de tumeurs neuroendocrines

Certaines tumeurs endocrines sécrètent de la CT. Ce sont principalement les tumeurs pulmonaires (cancer à petites cellules et tumeur carcinoïde), mais aussi les phéochromocytomes, insulinomes, somatostatineomes, ... [2,19,25].

Pathologie nodulaire thyroïdienne

Le dépistage du CMT par le dosage systématique de CT en pathologie nodulaire thyroïdienne fait l'objet de controverses depuis plusieurs années. Ce dépistage a été prôné et largement réalisé par les Européens [26], mais non recommandé aux États-Unis dans un premier temps [19]. De

Tableau 1 Principales indications du dosage de calcitonine sérique.

Diagnostic de CMT

Dans un contexte héréditaire : NEM2B, NEM2A, CMT familiaux

Dans un contexte sporadique

Suivi des CMT opérés non guéris

Diagnostic de tumeur neuroendocrine autre

Dépistage en pathologie thyroïdienne nodulaire

Si suspicion de malignité (clinique, échographique, cytologique)

De principe avant toute chirurgie

CMT : cancer médullaire de la thyroïde.

Tableau 2 Prévalence des cancers médullaires de la thyroïde (CMT) et des hypercalcitoninémies non dues à des CMT publiées lors de l'utilisation du dosage systématique de calcitonine en pathologie nodulaire.

Références	Années	n	HRCT %	CMT %	HRCT non dues CMT
Pacini ^a	1994	1385	0,57	0,57	
Henry ^a	1996	2975	1,6	0,47	1,1
Niccoli ^a	1997	1167	3	1,4	1,6
Vierhapper ^a	1997	1062	3,2	0,56	2,5
Hahm ^a	2001	1448	3,9	0,69	3,2
Jacobone ^a	2002	7276	0,9	0,6	0,3
Papi ^a	2006	1425	1,6	0,7	0,9
Vierhapper ^a	2005	25 669	4,9	0,3	4,5
Costante et al. [26]	2007	5817	4,84	0,26	4,58
Rink et al. [14]	2009	21 928	4,27	0,18	4,09
Hanselgren ^a	2009	959	4,67	0,6	4,07
Chambon et al. [33]	2010	2733	1,57	0,4	1,17

n : nombre de sujets étudiés ; CMT ; cancer médullaire de la thyroïde ; HRCT : hypercalcitoninémie.

^a Ce travail est cité par Kloos et al. dans leur texte de recommandations sur les cancers médullaires de la thyroïde [19].

nouvelles recommandations américano-européennes [27] et françaises viennent d'être éditées [28]. La précocité du diagnostic d'un cancer médullaire sporadique est un challenge. Le but est de permettre aux chirurgiens d'avoir d'emblée un geste adéquat afin de guérir le patient. Les résultats de l'utilisation systématique du dosage de CT en pathologie nodulaire thyroïdienne depuis une vingtaine d'année sont nuancés. À ce jour, les études publiées ont montré une amélioration de la survie mais pas une baisse de la mortalité. Les critères requis par l'OMS pour un dosage systématique de bCT en pathologie nodulaire thyroïdienne ne sont ici que partiellement remplis [29].

Valeur sémiologique d'une hypercalcitoninémie

Hypercalcitoninémie signifie que le taux de CT est supérieur aux normes. On constate que, dans la littérature, les seuils de normalité varient de 10 à 20 pg/mL pour les populations mixtes femmes et hommes et qu'ils varient aussi du simple au double pour des normes sexe spécifiques. Cela explique que les chiffres d'hypercalcitoninémie publiés varient de 0 à 4,8 % (Tableau 2).

Le CMT est une pathologie rare dont la prévalence est estimée autour de 0,4 % (variations entre 0,2 et 1,4 %) [19].

Tableau 3 Facteurs indépendants d'un cancer médullaire de la thyroïde pouvant augmenter la concentration de calcitonine sérique.

Facteurs liés au patient

Sexe

Âge et poids (IMC)

Facteurs liés à une tumeur endocrine extrathyroïdienne

Tumeur carcinoïde bronchique et digestive

Tumeur pulmonaire à petites cellules

Autre tumeur neuroendocrine (phéochromocytome)

Facteurs d'origine fonctionnelle

Hypergastrinémie due à la prise d'inhibiteurs de la pompe à protons, ou à une gastrite fundique atrophique, ou à un gastrinome

Insuffisance rénale (dialyse)

Pseudo-hypoparathyroïdie de type 1A

Par hyperplasie des cellules C réactionnelle

À une pathologie thyroïdienne auto-immune (actuellement controversé)

À un cancer thyroïdien différencié de souche vésiculaire

Au tabac

Facteurs liés aux dosages (interférences)

Présence d'anticorps hétérophiles

Sepsis (élévation massive de procalcitonine)

IMC : indice de masse corporelle.

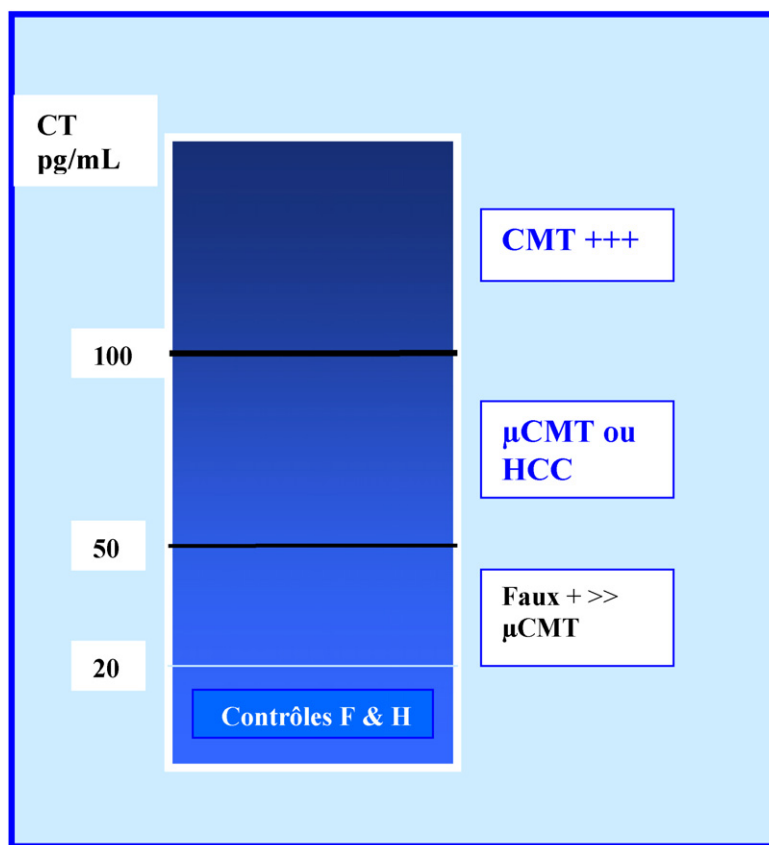


Figure 3 Interprétation des valeurs de calcitonine sérique.

La prévalence des hypercalcitoninémies observées lorsqu'on utilise le dosage systématique de CT en pathologie nodulaire thyroïdienne est de l'ordre de 4% pour un seuil de CT à 10 pg/mL (variations entre 0 et 4,6%) (Tableau 2), c'est-à-dire largement supérieure à celle du CMT. Les principaux facteurs pouvant influencer le taux de CT sérique et créer des hypercalcitoninémies non dues à des CMT sont réunis dans le Tableau 3.

En pathologie nodulaire thyroïdienne, dans au moins 95% des cas, les concentrations de CT mesurées sont dans les limites de la normale : ce qui est rassurant. Des normes spécifiques par sexe chez l'adulte nous semblent plus adaptées à une interprétation fine des taux de bCT. Il est admis que pour les patients avec hypercalcitoninémie modérée le risque de microCMT est plus élevé chez la femme que chez l'homme. Costante et al. ont trouvé une valeur prédictive positive de CMT à 100% pour un taux de bCT au moins égal à 100 pg/mL [26]. Les patients présentant un microCMT (taille < 1 cm) ont des concentrations de bCT généralement comprises entre 5 et 100 pg/mL. Le problème réside dans l'interprétation et la prise en charge des valeurs de bCT modérément augmentées [29–32]. La majorité d'entre-elles sont rencontrées pour des concentrations de bCT comprises entre 10 et 30 pg/mL (80% dans l'étude de Costante et al. sont entre 10 et 20 pg/mL) pour des hommes potentiellement en surpoids, d'âge avancé, fumeurs actifs ou déprivés [15,26]. Pour ces taux de bCT, la valeur prédictive positive de CMT est faible [26]. Les principaux critères d'interprétation d'une calcitonémie sont

schématisés sur la Fig. 3. Le mécanisme de sécrétion de la CT implique essentiellement la calcémie (particulièrement la fraction ionisée) et la gastrinémie. Son élimination est rénale. L'hypercalcémie chronique des hyperparathyroïdies primaires n'induit pas d'élévation de la CT [34]. En revanche, l'élévation aiguë de la calcémie réalisée par injection de gluconate de calcium augmente les taux sériques de CT [8].

Devant un taux modérément augmenté de CT (> 15 pg/mL pour les femmes et > 30 pg/mL pour les hommes), conformément aux recommandations françaises de prise en charge des nodules thyroïdiens [28], il est conseillé de contrôler (trois à 12 mois plus tard) la valeur de bCT. La chirurgie sera envisagée s'il est constaté une progression du taux de bCT et/ou si la concentration est supérieure à 50 pg/mL. Une troisième évaluation sera réalisée à distance si le taux est resté stable. On arrêtera les évaluations en cas de diminution de la concentration (Fig. 4).

En ce qui concerne les tests de stimulation, il est maintenant admis que leur apport est limité car ils ne permettent pas de dissocier les situations de microCMT de celles d'hyperplasies des cellules C pour lesquelles le chevauchement des concentrations de bCT et de CT stimulées est important. Ces tests augmentent la sensibilité mais pas la spécificité [20,32]. Une faible réponse (< 2 fois la norme) est en faveur d'une tumeur endocrine extrathyroïdienne.

Des thyroïdectomies prophylactiques chez les enfants mutés sont maintenant pratiquées. Elles sont programmées en fonction du niveau de risque de la mutation, de l'âge de

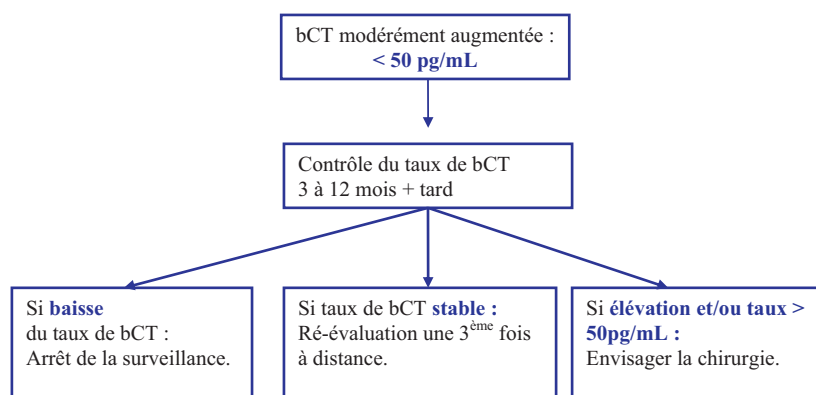


Figure 4 Conduite à tenir devant une élévation modérée de calcitoninémie de base sérique.

l'enfant et de plus en plus en fonction de la détectabilité du taux de CT sérique [19,20]. Une étude récente française [20] effectuée sur 170 patients (âge inférieur à 20 ans et *RETt* muté) a étudié les facteurs de guérison de ces sujets. Il apparaît qu'un taux de bCT préopératoire inférieur à 30 pg/mL permet la guérison de tous les patients (sensibilité = 100 %, spécificité = 82 %).

Conclusion

La CT est le marqueur sensible et spécifique des CMT. C'est un marqueur diagnostique, pronostique et de suivi. L'utilisation du dosage systématique de CT en pathologie nodulaire thyroïdienne fait encore l'objet de controverses. Afin d'éviter toute perte de chance et les prises en charge thérapeutiques inadaptées, il est recommandé, au minimum, de mesurer la CT sérique dans un contexte héréditaire connu de CMT, de flush, de diarrhée motrice, en cas de suspicion clinique, échographique, cytologique d'un nodule thyroïdien, et de principe avant toute intervention pour goitre ou nodule. Des dosages fiables de CT existent. La dissociation des normes femmes et hommes est souhaitée pour une meilleure interprétation des hypercalcitoninémies modérées. Les tests de stimulation n'apportent que peu d'information supplémentaire et tendent à être abandonnés.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Becker KL, Nylen ES, Cohen R, Silva OL, Snider RH. Calcitonin gene family of peptides. In: "Principles and practice of endocrinology and metabolism". 2nd ed. Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co; 1996, p. 474–83.
- [2] Leboulleux S, Baudin E, Travagli JP, Schlumberger M. Medullary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf) 2004;61:299–310. Review.
- [3] Niccoli-Sire P, Conte-Devolx B. Multiple endocrine neoplasia type 2. Ann Endocrinol (Paris) 2007;68:317–24.
- [4] Kratzsch J, Petzold A, Raue F, Reinhardt W, Brocker-Preuss M, Görges R, et al. Basal and stimulated calcitonin and procalcitonin by various assays in patients with and without medullary thyroid cancer. Clin Chem 2011;57:467–74.
- [5] Algéciras-Schimmich A, Preissner CM, Theobald JP, Finseth MS, Grebe SK. Procalcitonin: a marker for the diagnosis and follow-up of patients with medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:861–8.
- [6] Leboeuf R, Langlois MF, Martin M, Ahnadi CE, Fink GD. "Hook effect" in calcitonin immunoradiometric assay in patients with metastatic medullary thyroid carcinoma: case report and review of the literature. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:361–4.
- [7] Erdoğan MF, Güllü S, Başkal N, Uysal AR, Kamel N, Erdoğan G. Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:897–9.
- [8] Doyle P, Düren C, Nerlich K, Verburg FA, Grelle I, Jahn H, et al. Potency and tolerance of calcitonin stimulation with high-dose calcium versus pentagastrin in normal adults. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:2970–4.
- [9] Boi F, Maurelli I, Pinna G, Atzeni F, Piga M, Lai ML, et al. Calcitonin measurement in wash-out fluid from fine needle aspiration of neck masses in patients with primary and metastatic medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:2115–8.
- [10] Machens A, Ukkat J, Hauptmann S, Dralle H. Abnormal carcinoembryonic antigen levels and medullary thyroid cancer progression: a multivariate analysis. Arch Surg 2007;142: 289–93.
- [11] Walter MA, Meier C, Radimerski T, Iten F, Kränzlin M, Müller-Brand J, et al. Procalcitonin levels predict clinical course and progression-free survival in patients with medullary thyroid cancer. Cancer 2010;116:31–40.
- [12] Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Thyroid 2003;13:3–126.
- [13] Elisei R, Bottici V, Luchetti F, Di Coscio G, Romei C, Grasso L, et al. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:163–8.
- [14] Rink T, Truong PN, Schroth HJ, Diener J, Zimny M, Grünwald F. Calculation and validation of a plasma calcitonin limit for early detection of medullary thyroid carcinoma in nodular thyroid disease. Thyroid 2009;19:327–32.
- [15] d'Herbomez M, Caron P, Bauters C, Cao CD, Schlienger JL, Sapin R, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans:

- influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2007;157:749–55.
- [16] Verga U, Morpurgo PS, Vaghi I, Radetti G, Beck-Peccoz P. Normal range of calcitonin in children measured by a chemiluminescent two-site immunometric assay. *Horm Res* 2006;66:17–20.
- [17] Guyétant S, Bléchet C, Saint-André JP. C-cell hyperplasia. *Ann Endocrinol (Paris)* 2006;67:190–7 [Review].
- [18] Basuyau JP, Mallet E, Leroy M, Brunelle P. Reference intervals for serum calcitonin in men, women, and children. *Clin Chem* 2004;50:1828–30.
- [19] Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009;19:565–612.
- [20] Rohmer V, Vidal-Trecan G, Bourdelot A, Niccoli P, Murat A, Wemeau JL, et al. Prognostic factors of disease-free survival after thyroidectomy in 170 young patients with a RET germline mutation: a multicenter study of the groupe français d'étude des tumeurs endocrines. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E509–18.
- [21] Wohllk N, Schweizer H, Erlic Z, Schmid KW, Walz MK, Raue F, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:371–87. Review.
- [22] Cohen R, Campos JM, Salaün C, Heshmati HM, Kraimps JL, Proye C, et al. Preoperative calcitonin levels are predictive of tumor size and postoperative calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma. Groupe d'études des tumeurs à calcitonine (GETC). *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:919–22.
- [23] Barbet J, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF, GTE Study Group 2005 Prognostic impact of serum calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling-times in patients with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6077–84.
- [24] Giraudet AL, Vanel D, Leboulleux S, Aupérin A, Dromain C, Chami L, et al. Imaging medullary thyroid carcinoma with persistent elevated calcitonin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4185–90.
- [25] Do Cao C, Mekinian A, Ladsous M, Aubert S, D'Herbomez M, Patou F, et al. Hypercalcitonemia revealing a somatostatinoma. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;71:553–7.
- [26] Costante G, Durante C, Francis Z, Schlumberger M, Filetti S. Determination of calcitonin levels in C-cell disease: clinical interest and potential pitfalls. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2009;5:35–44.
- [27] Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick DS, Valcavi R, Hegedüs L, et al. Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: executive summary of recommendations. *J Endocrinol Invest* 2010;33(5 Suppl.):51–6.
- [28] Wémeau JL, Sadoul JL, d'Herbomez M, Monpeyssen H, Trammalloni J, Leteurre E, et al. Recommandations de la Société française d'endocrinologie pour la prise en charge des nodules thyroïdiens. *Presse Med* 2011;40(9 Pt 1):793–826.
- [29] d'Herbomez M. Calcitonin: indications and interpretation. *Presse Med* 2011;40:1141–6.
- [30] Elisei R. Routine serum calcitonin measurement in the evaluation of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:941–53.
- [31] Cherenko M, Slotema E, Sebag F, De Micco C, Henry JF. Mild hypercalcitoninaemia and sporadic thyroid disease. *Br J Surg* 2010;97:684–90.
- [32] Costante G, Filetti S. Early diagnosis of medullary thyroid carcinoma: is systematic calcitonin screening appropriate in patients with nodular thyroid disease? *Oncologist* 2011;16:49–52.
- [33] Chambon G, Alovisei C, Idoux-Louche C, Reynaud C, Rodier M, Guedj AM, et al. The use of preoperative routine measurement of basal serum thyrocalcitonin in candidates for thyroidectomy due to nodular thyroid disorders: results from 2733 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:75–81.
- [34] Conte-Devolx B, Morlet-Barla N, Roux F, Sebag F, Henry JF, Niccoli P. Could primary hyperparathyroidism-related hypercalcemia induce hypercalcitoninemia? *Horm Res Paediatr* 2010;73(5):372–5.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Transaminases profile in Algerian patients with type 2 diabetes mellitus

Profil des transaminases chez des patients algériens diabétiques de type 2

A. Gouri^{a,*}, A. Dekaken^b, S. Rouabhia^c, A.A. Bentorki^a, A. Yakhlef^d

^a Laboratoire de biochimie médicale, hôpital IBN-ZOHR, Guelma 24000, Algeria

^b Service de médecine interne, hôpital El Okbi, Guelma 24000, Algeria

^c Service de médecine interne, CHU Touhami Benflis, Batna 05000, Algeria

^d Service d'hématologie, hôpital IBN-ZOHR, Guelma 24000, Algeria

Received 22 June 2012; accepted 3 July 2012

KEYWORDS

Type 2 diabetes mellitus;
Alanine aminotransferase;
Aspartate aminotransferase

Summary Elevations of aminotransferase are frequently encountered in patients with type 2 diabetes mellitus, and these perturbations are mostly attributed to fatty infiltration of the liver. The aim of this study was to assess the prevalence of elevated aminotransferase in a cohort of Algerian patients with type 2 diabetes mellitus and determine the relation of this elevation to different metabolic parameters. One hundred and thirty-seven patients with type 2 diabetes mellitus (47 males and 90 females) were included in the study. Elevations in aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) were found in 6.5% ($n=9$) and 8.7% ($n=12$) of our patients respectively. Male gender (OR=2.97, CI: 0.88–9.95), and high triglycerides levels (OR=2.03, CI: 0.58–7.09) were associated with increased risk of elevated ALT levels. The prevalence of elevated AST level increased with increased age (OR=2.09 for patients aged 25–45 and OR=2.77 for those who were over 65 years old) and increased triglycerides levels (OR=8.51, CI: 1.03–70.07). The prevalence of elevated aminotransferase in our study was in accordance with previously reported high prevalence rates of aminotransferase elevation in patients with type 2 diabetes mellitus in other populations. These findings provide support to the practice of routine liver function monitoring in subjects with type 2 diabetes mellitus.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Diabète type 2 ;
Alanine aminotransférase ;
Aspartate aminotransférase

Résumé Au cours du diabète de type 2, les augmentations de transaminases sont très fréquentes et elles sont souvent attribuées à une infiltration lipidique au niveau du foie. L'objectif de cette étude est d'évaluer la prévalence de l'élévation des transaminases dans une cohorte algérienne de patients diabétiques de type 2. Cent trente-sept patients atteints de diabète type 2 (47 hommes et 90 femmes) ont été inclus dans cette étude. Des élévations en aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT) ont été trouvées chez 6,5% ($n=9$) et 8,7% ($n=12$) de nos patients respectivement. Un sexe masculin (OR=2,97,

* Corresponding author.

E-mail address: pharmagor@gmail.com (A. Gouri).

CI: 0,88–9,95), et des taux élevés de triglycérides (OR = 2,03, CI: 0,58–7,09) ont été associés à un haut risque d'ALAT élevés. La prévalence d'un taux élevé d'ASAT augmente avec l'âge (OR = 2,09 pour les patients âgés de 25–45 ans et OR = 2,77 pour ceux qui ont plus de 65 ans) et avec l'augmentation des taux de triglycérides (OR = 8,51, CI: 1,03–70,07). La prévalence de transaminases élevées dans notre étude concorde avec celles qui ont rapporté une forte prévalence de transaminases élevées chez les diabétiques de type 2 dans d'autres populations. Ces résultats constituent un support pour la pratique en routine d'un suivi de la fonction hépatique chez les diabétiques type 2.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Liver disease constitutes a significant comorbidity in diabetes mellitus (DM). The key role of the liver in blood glucose control as well as the influence of liver disease on peripheral glucose metabolism and whole-body insulin sensitivity, contributes to DM in the presence of advanced liver disease.

New insights into this association came from the recognition that:

- DM itself may be a cause of liver disease, via non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), cirrhosis, and ultimately hepatocellular carcinoma;
- hepatitis C virus may have direct diabetogenic effects;
- post-transplantation DM is a major cause of morbidity and mortality in subjects following liver transplantation [1].

Recent studies have shown that biomarkers of liver injury can independently predict the risk of impaired fasting glucose, type 2 DM (T2DM) and metabolic syndrome [2–18].

Serum activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) are the most frequently used indicators of liver disease [19], and elevated activities of serum aminotransferase are frequently found in subjects with T2DM [20–24]. In the absence of other causes of liver disease, an unexplained elevation in ALT is commonly considered a surrogate marker of NAFLD [25]. NAFLD is characterized by fat infiltration of the liver that can evolve into steatohepatitis, fibrosis, and eventually cirrhosis [26]. The aim of this study was to assess the prevalence of elevated ALT and AST in a cohort of Algerian patients with T2DM and determine the relation of this elevation to different metabolic parameters.

Materials and methods

Subjects and study design

We conducted a retrospective cohort study, which included 137 patients with T2DM attending the diabetes unit at IBN-ZOHR Hospital, and the internal medicine department at El Okbi Hospital of Guelma (East of Algeria) followed up between January 2008 and January 2012.

Retrospective data were collected from patients' charts including: age, sex, blood pressure, past medical history, clinical findings and laboratory results. We excluded patients

with history of liver diseases, positive serological finding for hepatitis B or C, alcohol consumption and history of any medication use thought to cause elevation in liver enzymes such as corticoids, amiodarone and tamoxifen.

Laboratory measurements

For determination of serum concentrations of fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, AST and ALT, blood was drawn in the morning after 12 hours of overnight fast.

The fasting glucose level was measured using the GOD-POD method. Total cholesterol (CHOD-PAP method) and triglyceride (GPO-PAP method) were measured using kits from SPINREACT, Spain. Activities of ALT and (AST) were measured by means of a kinetic ultraviolet test for clinical chemistry analyzers (SECOMAM Basic analyzer, France). The cut-off value for diagnosis of elevated ALT and AST activities was set at 40 IU/L, according to our laboratory normal limits.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means \pm standard deviation (SD); and categorical variables as frequencies and percentages.

The Chi² (χ^2) test was used to determine the association of elevated ALT and AST levels with different variables. Multivariate analysis using logistic regression analysis was used to determine factors associated with elevated ALT and AST levels. The association of a particular variable was expressed as odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI).

All statistical analyses were performed with the SPSS 16.0 (SPSS, Chicago, IL) statistical package for Windows. A two-tailed *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results and discussion

The demographic and clinical characteristics of the participants have been displayed in Table 1. Among the 137 diabetics enrolled in this study, 34.30% (*n* = 47) were males and 65.69% (*n* = 90) were females. The mean age was 50.34 \pm 16.64 years, ranging between 19 and 86 years. Hypertension and cardiovascular disease (CVD) were found in 15.32% and 6.56% of diabetic patients respectively (Table 1).

Table 1 Demographic and clinical characteristics of type 2 diabetes mellitus patients.

Variable	N (%)
Age (years)	50.34 ± 16.64
19–45	42 (30.56)
46–65	74 (54.01)
> 65	21 (15.32)
Sex	
Male	47 (34.30)
Female	90 (56.69)
Hypertension (%)	21 (15.32)
CVD (%)	9 (6.56)
Liver enzymes U/L	
ALT > 40	12 (8.75)
AST > 40	9 (6.56)
ALT > 40 and AST > 40	7 (5.10)
FBS (g/l)	1.63 ± 0.89
Total cholesterol (mmol/L)	4.68 ± 1.19
Triglycerides (mmol/L)	1.82 ± 2.32

Data were expressed as mean ± SD or prevalence (%). CVD: cardiovascular disease; FBS: fasting blood sugar.

Overall, the prevalence of elevated ALT was 08.75% ($n=12$) with the gender-wise prevalence of 14.8% ($n=7$) in men, and 5.55% ($n=5$) in women (Table 2). The prevalence of elevated AST was 6.56% ($n=9$) with the gender-wise

prevalence of 10.6% ($n=5$) in men and 4.4% ($n=4$) in women. Only 5.1% ($n=7$) showed elevated levels of both ALT and AST.

The prevalence of elevated ALT and AST levels according to demographic and clinical characteristics is shown in Table 2. Male gender (OR=2.97, CI: 0.88–9.95) and high triglycerides level (OR=2.03, CI: 0.58–7.09) were associated with an increased risk of elevated ALT levels. Patients aged 45 to 65 years had a higher tendency to have elevated ALT compared to younger patients (OR=1.51, CI: 0.93–6.29).

The prevalence of elevated AST level increased with increased age (OR=2.09 for patients aged 25–45 and OR=2.77 for those who were over 65 years old) and increased triglycerides levels (OR=8.51, CI: 1.03–70.07).

The multivariate analysis of risk factors for elevated ALT and AST shows that the only factors associated with elevated ALT and AST levels were gender, and high triglycerides levels. Elderly patients had a higher tendency to have elevated ALT and AST levels compared to younger patient (Table 2).

The prevalence of elevated aminotransferase levels is not known in the Algerian population. In western countries, elevated aminotransferase levels are common and it has been documented in certain groups such as blood donors [27] overweight, obese adolescents [28] and general population [29,30]. This elevation was strongly related to obesity, diabetes and dyslipidemia, and their measurement may act as a surrogate marker of NAFLD presence [26,31].

Table 2 Prevalence of elevated aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels and odds ratio in type 2 diabetes mellitus patients for various risk factors.

Variable	Total	Increased AST activity				Increased ALT activity			
		n (%)	OR (95% CI)	χ^2	P value	n (%)	OR (95% CI)	χ^2	P value
Gender									
Male	47	5 (10.6)	1.63 (0.41–6.41)	1.93	0.16	7 (14.8)	2.97 (0.88–9.95)	3.37	0.06
Female ^a	90	4 (4.4)	1			5 (5.5)	1		
Age groups (years)									
19–45 ^a	42	1 (2.3)	1			3 (7.4)	1		
46–65	74	7 (14.9)	2.09 (0.41–10.55)	2.70	0.25	8 (10.8)	1.51 (0.93–6.29)	0.94	0.62
> 65	21	1 (4.7)	2.77 (0.16–46.77)			1 (4.7)	0.88 (0.08–9.1)		
Hypertension									
No ^a	116	9 (7.7)	—	1.45	0.22	11 (9.4)	1	0.37	0.54
Yes	21	0	—			1 (4.7)	0.55 (0.07–3.9)		
CVD									
No ^a	128	9 (7.0)	—	0.44	0.50	12 (9.3)	—	0.60	0.42
Yes	9	0	—			0	—		
FBS (mmol/L)									
< 7.75 ^a	75	6 (8.0)	1	0.55	0.45	8 (10.3)	1	0.75	0.38
> 7.75	62	3 (4.8)	0.58 (0.14–2.44)			4 (10.3)	0.57 (0.16–2.01)		
Cholesterol (mmol/L)									
< 5.18 ^a	103	8 (7.7)	1	0.97	0.32	9 (10.6)	1	0.000	0.98
> 5.18	34	1 (2.93)	0.36 (0.04–2.98)			3 (8.8)	1.01 (0.25–3.97)		
Triglycerides (mmol/L)									
< 1.70 ^a	67	1 (1.5)	1	5.50	0.01	4 (5.9)	1	1.27	0.25
> 1.70	70	8 (11.4)	8.51 (1.03–70.07)			8 (11.4)	2.03 (0.58–7.09)		

CI: confidence interval; χ^2 : Chi² test; OR: odds ratio; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CVD: cardiovascular disease; FBS: fasting blood sugar.

^a Reference category.

The present study shows that ALT was elevated in 8.7% of our T2DM patients (14.8% in males and 5.5% in females). Our results are consistent with the finding of Erbey et al. who reported prevalence rates of 10.7% and 5.3% in type 2 diabetic men and women respectively [21] and West et al. who reported a higher rate of 12.1%; 14.4% in men and 9.3% in women with T2DM [32]. Furthermore, Meltzer and Everhart have shown that diabetes is associated with liver injury independent of effects of drinking habits or overweight [33]. In their large epidemiological study of 2999 persons, 6% of men and 2% of women had elevated serum ALT activity. Of the 104 men and 139 women with diabetes, 11 and 3% had elevated ALT activity respectively.

In this study, we have found that patients aged 45 to 65 years had a higher tendency to have elevated ALT compared to younger (25–45 years) and very older diabetic patients (over 65 years). This finding is in agreement with the results of Hermos and al. who found that ALT levels are significantly different between age lower than 52 years group and upper 64 [34].

In addition, the prevalence of elevated AST level increased with increased age.

In multivariate analysis, the study concluded that both male gender and high triglycerides levels is independent predictor of ALT levels. Higher abdominal fat content in men compared to women would explain this finding which has been previously reported in other studies [32–36].

Previously, Forlani et al. have shown that elevated triglycerides was independently associated with a high ALT levels [22]. This finding can be attributed to the fact that in the presence of insulin resistance, increased flux of non-esterified free fatty acid from visceral fat to liver favors the accumulation of triglycerides in the hepatocytes and induces liver injury [37,38].

We suspect that most cases of unexplained aminotransferase elevations in our patients are caused by NAFLD. There are several reasons for this hypothesis. First, in biopsy studies of patients referred for aminotransferase elevations, NAFLD was the most common histological finding [39–42]. Second, in our study unexplained aminotransferase elevation was significantly associated with high triglycerides levels, diabetes, and hypertension, which is consistent with other studies on NAFLD [43–45].

The findings of this study cannot prove a causal link between diabetic complications and liver enzymes. However, an association between diabetic complications and activity of liver enzymes could indicate the need for more intense screening of diabetic complications in subjects with elevated aminotransferase.

Furthermore, recent studies have explored the relationship between elevated ALT levels, diabetes and coronary events, and have demonstrated that elevated ALT levels increase the risk of future CVD events independently of metabolic syndrome [4,6,46–48]. However, the relationship between ALT levels and mortality from CVD has not been well established.

In summary, the results of this study are in accordance with previously reported high prevalence rates of aminotransferase elevation in patients with T2DM in other populations. Although there are currently no consensus guidelines or recommendations regarding liver function test

screening in patients with T2DM, these findings lend support to the practice of routine liver function monitoring in subjects with T2DM. Further studies are necessary to confirm these findings and to elucidate the pathophysiological mechanisms.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:63–70.
- [2] Jiamjarasrangsi W, Sangwatanaroj S, Lohsoonthorn V, Lertmaharit S. Increased alanine aminotransferase level and future risk of type 2 diabetes and impaired fasting glucose among the employees in a university hospital in Thailand. *Diabetes Metab* 2008;34:283–9.
- [3] Jo SK, Lee WY, Rhee EJ, Won JC, Jung CH, Park CY, et al. Serum γ -glutamyl transferase activity predicts future development of metabolic syndrome defined by 2 different criteria. *Clinica Chimica Acta* 2009;403:234–40.
- [4] Yuna KE, Shina CY, Yoon YS, Parka HS. Elevated alanine aminotransferase levels predict mortality from cardiovascular disease and diabetes in Koreans. *Atherosclerosis* 2009;205:533–7.
- [5] Vosarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1889–95.
- [6] Monamia M, Bardinib G, Lamannaa C, Palab C, Crescib L, Francesconi B, et al. Liver enzymes and risk of diabetes and cardiovascular disease: results of the Firenze Bagno a Ripoli (FIBAR) study. *Metabolism* 2008;57:387–92.
- [7] Nakanishi N, Nishina K, Li W, Sato M, Suzuki K, Tatara K. Serum gamma-glutamyltransferase and development of impaired fasting glucose or type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *J Intern Med* 2003;254:287–95.
- [8] Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetes Care* 2004;27:1427–32.
- [9] Andre P, Balkau B, Born C, Royer B, Wilpart E, Charles MA, et al. Hepatic markers and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: a three-year follow-up study. The DESIR study. *Diabetes Metab* 2005;31:542–50.
- [10] Andre P, Balkau B, Born C, Charles MA, Eschwège E. Three-year increase of gamma-glutamyltransferase level and development of type 2 diabetes in middle-aged men and women: the DESIR cohort. *Diabetologia* 2006;49:2599–603.
- [11] Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht Jr LE, D'Agostino RB, Kempf J, et al. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2004;53:2623–32.
- [12] Kim DJ, Noh JH, Cho NH, Lee BW, Choi YH, Jung JH, et al. Serum gamma-glutamyltransferase within its normal concentration range is related to the presence of diabetes and cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 2005;22:1134–40.
- [13] Lee DH, Ha MH, Kim JH, Christiani DC, Gross MD, Steffes M, et al. Gamma-glutamyltransferase and diabetes—a 4-year follow-up study. *Diabetologia* 2003;46:359–64.

- [14] Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, Posadas R, Williams K, Haffner SM, et al. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005;28:1757–62.
- [15] Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 1998;21:732–7.
- [16] Sattar N, Scherbakova O, Ford I, O'Reilly DS, Stanley A, Forrest E, et al. Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. *Diabetes* 2004;53:2855–60.
- [17] Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005;28:2913–8.
- [18] Doi Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Iwase M, Tanizaki Y, et al. Liver enzymes as a predictor for incident diabetes in a Japanese population: the Hisayama study. *Obesity (Silver-Spring)* 2007;15:1841–50.
- [19] Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005;172(3):367–79.
- [20] Salmela PI, Sotaniemi EA, Niemi M, Maentausta O. Liver function tests in diabetic patients. *Diabetes Care* 1984;7:248–54.
- [21] Erbey JR, Silberman C, Lydick E. Prevalence of abnormal serum alanine transaminase levels in obese patients and patients with type 2 diabetes. *Am J Med* 2000;109(7):588–90.
- [22] Forlani G, Di Bonito P, Mannucci E, Capaldo B, Genovese S, Orrasch M, et al. Prevalence of elevated liver enzymes in type 2 diabetes mellitus and its association with the metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 2008;1(2):146–52.
- [23] udi L, Toukan A, Khader Y, Ajlouni K, Khatib MA. Prevalence of elevated hepatic transaminases among Jordanian patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Saudi Med* 2010;30(1):25–32.
- [24] Idris AS, Mekky KFH, Abdalla BEE, Ali KA. Liver function tests in type 2 Sudanese diabetic patients. *Int J Nutr Metab* 2011;3(2):17–21.
- [25] Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22(6):437–43.
- [26] Angulo P. Non-alcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221–31.
- [27] Kundrotas LW, Clement DJ. Serum alanine aminotransferase (ALT) elevation in asymptomatic US Air Force basic trainee blood donors. *Dig Dis Sci* 1993;38:2145–50.
- [28] Strauss RS, Barlow SE, Dietz WH. Prevalence of abnormal serum aminotransferase values in overweight and obese adolescents. *J Pediatr* 2000;136:727–33.
- [29] Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, et al. Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos study. *Hepatology* 1994;20:1442–9.
- [30] Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003;98(5):960–7.
- [31] Trombetta M, Spiazzi G, Zoppini G, Muggeo M. Review article: type 2 diabetes and chronic liver disease in the Verona diabetes study. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:524–7.
- [32] West J, Brouil J, Gazis A, Jackson L, Mansell P, Bennett A, et al. Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes. *Q J Med* 2006;99:871–6.
- [33] Meltzer AA, Everhart JE. Association between diabetes and elevated serum alanine aminotransferase activity among Mexican Americans. *Am J Epidemiol* 1997;146:565–71.
- [34] Hermos JA, Cohen SA, Hall R, Gagnon DR, Brophy MT, Fiore LD. Association of elevated alanine aminotransferase with BMI and diabetes in older veteran outpatients. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80(1):153–8.
- [35] Ruhl CE, Everhart JE. Determinants of the association of overweight with elevated serum aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2003;124:71–9.
- [36] Park HS, Han JH, Choi KM, Kim SM. Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents. *Am J Clin Nutr* 2005;82:1046–51.
- [37] Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, et al. Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;484:1513–7.
- [38] Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Corner A, Bergholm R, et al. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum Alanine Aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31:165–9.
- [39] Ratzin V, Giral P, Charlotte F, Bruckert E, Thibault V, Theodorou I, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;118:1117–23.
- [40] Hultcrantz R, Glaumann H, Lindberg G, Nilsson LH. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:109–13.
- [41] Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J Hepatol* 2001;35:195–9.
- [42] Daniel S, Ben Menachem T, Vasudevan G, Ma CK, Blumenkehl M. Prospective evaluation of unexplained chronic liver transaminase abnormalities in asymptomatic and symptomatic patients. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3010–4.
- [43] Diehl AM. Non-alcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 1999;19:221–9.
- [44] Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990;11:74–80.
- [45] Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103–9.
- [46] Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine R.J., et al. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007;191:391–6.
- [47] Schindhelm RK, Diamant M, Bakker SJL, van Dijk RA, Scheffer PG, Teerlink T, et al. Liver alanine aminotransferase, insulin resistance and endothelial dysfunction in normotriglyceridaemic subjects with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 2005;35:369–74.
- [48] Brea A, Mosquera D, Martin E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1045–50.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Myélome multiple : aspect clinique, diagnostic biologique et pronostic

Multiple myeloma: Clinical aspect, biological diagnosis and prognosis

A. Bouatay^{a,*}, S. Hizem^a, Y. Ben Youssef^b, F. Sayari^a, N. Braham^a,
A. Khélif^b, M. Kortas^a

^a Laboratoire d'hématologie, hôpital Farhat Hached, rue Ibn-Jazzar, 4000 Sousse, Tunisie

^b Service d'hématologie clinique, hôpital Farhat Hached, rue Ibn-Jazzar, 4000 Sousse, Tunisie

Reçu le 31 juillet 2012 ; accepté le 3 septembre 2012

KEYWORDS

Multiple myeloma;
Monoclonal
gammopathy;
Epidemiology;
Diagnosis;
Evolution

MOTS CLÉS

Myélome multiple ;
Gammopathie
monoclonale ;
Épidémiologie ;
Diagnostic ;
Évolution

Summary Multiple myeloma (MM) is characterized by plasma cells proliferation within the bone marrow and an excess of secreted monoclonal immunoglobulins. The authors report the results of an epidemiological, clinical, biological diagnosis and evolutive retrospective study including 54 cases of MM gathered in the hematology clinic at the CHU Farhat Hached Sousse during a three year period. The median age of the population is 67 years with sex-ratio: 1.7. Initial findings are bone pain (74.1% of patients), anemia syndrome (37%), and impaired general condition (31.5%). Serum protein electrophoresis showed a spike in 75.9%. Isotypes repartition is: IgG (61.8%), IgA (29.4%), monoclonal light chains (5.9%). A plasmocytosis more than 10% is detected in 76% of cases. Renal insufficiency is observed in 19% of cases. According to the Durie and Salmon classification, all of our patients are classified as stage III. Among other parameters, CRP and β 2-microglobulin level are increased (≥ 6 mg/L) in respectively 36.2% and 28.6% of the cases. The cytogenetic abnormalities are detected in six cases. The median survival is 10 months.

© 2012 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé Le myélome multiple (MM) est caractérisé par une prolifération clonale de plasmocytes envahissant la moelle osseuse et sécrétant une immunoglobuline monoclonale. Le but de cette étude est d'étudier les particularités épidémiologiques, cliniques et biologiques et de préciser les caractéristiques diagnostiques et pronostiques du MM. C'est une étude rétrospective incluant 54 patients admis au service d'hématologie clinique du CHU Farhat Hached de Sousse, durant une période de trois ans, pour suspicion du MM. L'âge moyen de notre population est de 67 ans avec un sex-ratio de 1,7. Le motif principal de consultation est une douleur osseuse (74,1 % des cas), un syndrome anémique (37 % des cas) et une altération de l'état général (31,5 % des cas). Un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines sériques a été noté chez seulement 41 patients (75,9 % des cas) dont IgG (61,8 %), IgA (29,4 %), chaînes légères (5,9 %).

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : bouatayamina@yahoo.fr (A. Bouatay).

Le myélogramme a révélé une infiltration plasmocytaire supérieure à 10 % dans 76 % des cas. L'insuffisance rénale a été observée dans 19 % des cas. Selon la classification pronostique de Durie et Salmon, tous nos patients sont classés stade III. L'étude de nouveaux facteurs pronostiques a montré une élévation de la CRP et du taux de la β 2-microglobuline (≥ 6 mg/L) dans respectivement 36,2 % et 28,6 % des cas. Les anomalies cytogénétiques ont été détectées chez six patients. La médiane de survie est de dix mois.

© 2012 Publié par Elsevier Masson SAS.

Introduction

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par une prolifération monoclonale de plasmocytes envahissant la moelle osseuse et sécrétant une immunoglobuline monoclonale [1]. C'est une maladie rare qui représente environ 80 % des gammopathies monoclonales malignes et 15 % des hémopathies malignes. Cette affection touche préférentiellement les sujets de plus de 40 ans avec un pic de fréquence entre 67 et 70 ans [2]. Les manifestations osseuses dominent le tableau clinique. Le diagnostic est basé sur l'association d'une plasmocytose médullaire supérieure à 10 %, d'une immunoglobuline monoclonale sérique et/ou urinaire à titre significatif et de signes cliniques en rapport avec la prolifération plasmocytaire maligne. Bien qu'il reste à ce jour incurable, le MM a connu, ces dernières années, des progrès permettant une amélioration de la prise en charge des patients : nouveaux critères diagnostiques et une meilleure compréhension de l'hétérogénéité du profil évolutif grâce à l'identification de nouveaux facteurs pronostiques et au développement de nouveaux traitements [1,3].

Le but de cette étude est d'étudier les particularités épidémiologiques, cliniques et biologiques et de préciser les caractéristiques diagnostiques et pronostiques d'une série de 54 cas de patients suspectés de MM colligés, au CHU Farhat Hached de Sousse.

Patients et méthodes

C'est une étude rétrospective (sur une période de trois ans) portant sur 54 patients hospitalisés, dans le service d'hématologie clinique pour suspicion de MM. Tous les patients ont bénéficié d'un bilan radiologique et biologique à visée diagnostique et pronostique : un examen radiologique par imagerie par résonance magnétique (IRM), une

électrophorèse des protéines (EP) sériques et urinaires, une immunofixation (IF) sérique et urinaire, un dosage pondéral des immunoglobulines Ig (G, A, D et M) par immunonéphélométrie, un myélogramme et/ou une biopsie ostéomédullaire (BOM), un caryotype, un dosage du calcium, de la créatinine, de la LDH, de la β 2-microglobuline et de la CRP.

Le diagnostic du MM a été retenu pour 48 patients sur 54 patients inclus dans cette étude, selon les critères établis par Southwest Oncology Group (SWOG) (Tableau 1) [4].

Quarante-trois patients atteints de MM ont bénéficié de la chimiothérapie : le Melphalan-Prednisone (MP) a été prescrit chez 22 patients âgés de plus de 65 ans ; le vincristine-adriamycine-dexaméthasone (VAD) a été prescrit chez sept patients âgés de moins de 65 ans et 14 patients ont été inclus dans le protocole national associant intensification de la chimiothérapie et greffe de cellules souches périphériques dont deux ont bénéficié d'autogreffe de cellules souches périphériques. Les autres patients ont été traités seulement par corticothérapie.

Résultats

Caractéristiques générales de la population d'étude

Notre population est constituée de 34 hommes et 20 femmes dont 30 hommes et 18 femmes sont atteints de MM. Le sex-ratio est de 1,7. L'âge moyen de nos patients est de 67 ans (extrêmes : 32–87 ans). La distribution des malades selon les tranches d'âge est représentée par la Fig. 1. Parmi les patients, 22,2 % sont tabagiques et 9,2 % ont été exposés aux produits chimiques, principalement les pesticides. Le motif principal de consultation est le syndrome osseux dans 74,1 % des cas (Tableau 2).

Tableau 1 Critères de diagnostic établis par le Southwest Oncology Group [4].

Critères majeurs	Critères mineurs
Plasmocytome sur biopsie tissulaire Infiltration plasmocytaire monoclonale > 30 %	Plasmocytose médullaire comprise entre 10 et 30 % Pic monoclonal (IgG < 35 g/L; IgA < 20 g/L) et/ou protéinurie de Bence Jones < 1 g/24 h)
Présence d'une Ig monoclonale sérique (IgG > 35 g/L; IgA > 20 g/L) et/ou urinaire (chaîne légères libres et urinaires responsables d'une protéinurie de Bence Jones > 1 g/24 h en l'absence d'amylose)	Lésions osseuses lytiques Diminution des Ig polyclonales inférieure à 50 % des intervalles de référence
Le diagnostic était confirmé si sont associées au moins un critère majeur et un critère mineur ou trois critères mineurs dont au moins a + b	

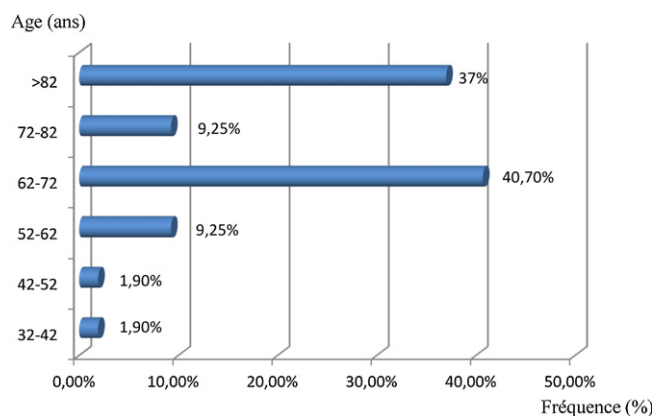


Figure 1 Répartition de la population d'étude en fonction de l'âge.

Tableau 2 Circonstances de découverte au cours du myélome multiple.

Circonstances de découvertes	Nombre	Fréquence (%)
Syndrome osseux	40	74,1
Syndrome anémique	20	37
Altération de l'état général	17	31,5
Compressions médullaires	6	11,1
Plasmocytome	5	9,3
Découverte fortuite	4	7,4
Insuffisance rénale	4	7,4
MGUS	1	1,9
Amylose	1	1,9

Signes radiologiques

Des anomalies radiologiques ont été notées chez 46 patients (Tableau 3).

Signes hématologiques

Le syndrome anémique est présent chez 87 % des patients et il est sévère (hémoglobine < 8,5 g/dL) dans 33,3 % des cas. L'anémie est de nature normochrome normocytaire arégénérative dans 75,9 % des cas. Une thrombopénie et une leucopénie sont retrouvées respectivement dans 33,3 % et 14,8 % des cas. L'examen du myélogramme a montré la présence d'une infiltration plasmocytaire supérieure à 10 % dans 76 % des cas. La présence de signes de dystrophies cellulaires (plasmocytes dystrophiques, plasmoblastes, proplasmocytes et lymphoplasmocytes) a été notée chez 43 patients. La BOM

Tableau 3 Principaux signes radiologiques.

	Nombre	Fréquence (%)
Ostéolyses	27	50
Compressions médullaires	8	15
Tassements	7	13
Fractures	4	7,4
Tumeurs	4	7,4

Tableau 4 Caractéristiques biologiques.

	Nombre	Fréquence (%)
Hémogramme		
Hémoglobine < 12 g/dL	47	87
Leucocytes < 4000/mm ³	8	14,8
Plaquettes < 150/mm ³	18	33,3
Infiltration plasmocytaire		
> 30 %	27	50
10–30 %	15	26
< 10 %	12	24
Vitesse de sédimentation		
> 100 mm	42	77,7
Paramètres biochimiques		
Protidémie > 80 g/L	24	44,4
Albuminémie < 35 g/L	47	87
Pic monoclonal	41	75,9
Zone gamma	27	65,8
Zone bêta	8	19,5
Zone alpha 2	6	14,6
Hypercalcémie > 3 mmol/L	14	26
Créatinémie > 175 μmol/L	10	19

a été réalisée dans 17 cas. Elle n'a pu confirmer l'infiltration plasmocytaire que dans 13 cas (Tableau 4).

Caractéristiques immunochimiques

Une hyperprotéinémie est observée dans 44,4 % des cas avec une moyenne de 81,62 g/L (extrêmes : 80–128 g/L). Un pic à l'EP a été noté chez 41 patients (Tableau 4). Toutefois, par manque de réactifs, seulement 34 patients ont bénéficié d'une IF donnant : IgG (61,8 %), IgA (29,4 %), chaînes légères (5,9 %) et IgM (2,9 %). Le typage des chaînes légères a été réalisée chez 17 patients avec huit cas de chaînes légères de type lambda et neuf cas de chaînes légères de type kappa pour un rapport kappa/lambda de 1,13 (Tableau 5).

Diagnostic positif

Le diagnostic positif du MM a été posé selon les critères établis par le SWOG pour 48 patients sur 54. Pour les six autres patients, il s'agit d'un cas de leucémie à plasmocytes, un cas de lupus érythémateux disséminé, trois cas porteurs de syndrome osseux et un cas de maladie de Waldenström.

Tableau 5 Répartition des isotypes.

	Nombre	Fréquence (%)
IgG	21	61,8
IgA	10	29,4
Chaînes légères	2	5,9
IgM	1	2,9

Évolution et facteurs pronostiques

La classification pronostique de Durie et Salmon a montré que tous nos patients sont de stade III dont 31 de stade III a et 17 de stade III b. D'autres facteurs pronostiques ont été étudiés. Des taux élevés de CRP et de la $\beta 2$ -microglobuline (≥ 6 mg/L) ont été retrouvés chez respectivement 36,2 % et 28,6 % de nos patients. Les anomalies cytogénétiques n'ont été détectées que dans six cas : trois cas d'hyperploïdie et trois cas d'anomalies impliquant les chromosomes 9 et 16 et une translocation t(5,7). La présence de plasmoblastes, facteur de mauvais pronostic, a été trouvée chez neuf patients.

Les infections constituent la complication la plus fréquente (52 % des cas), suivi par l'insuffisance rénale (10 % des cas) alors que les compressions médullaires, les manifestations neurologiques et l'insuffisance médullaire sont moins fréquentes. L'amylose reste une complication rare (5,6 % des cas).

Réponse thérapeutique et survie

Les critères de réponse au traitement sont déterminés selon ceux établis par le SWOG. Dans notre population nous avons obtenu trois cas de rémission complète mais qui ont rechuté après huit à 14 mois. Chez 14 patients une rémission partielle a été notée avec une persistance dans la plupart des cas de douleurs osseuses. Nous avons déploré cinq décès avec une médiane de survie de deux mois. La médiane de survie globale de notre population est de dix mois.

Discussion

Bien que le MM ait connu ces dernières années d'importants progrès dans la prise en charge des patients, il reste à ce jour une hémopathie incurable avec une médiane de survie de quatre à cinq ans qui tend à s'allonger ces dernières années [5,6]. Dans la présente étude, nous avons étudié les particularités cliniques, paracliniques, thérapeutiques et pronostiques de 54 cas de suspicion de MM, colligés dans le service d'hématologie clinique du CHU Farhat Hached du centre de la Tunisie.

L'âge moyen de notre population est de 67 ans avec 40,7 % des patients entre 62 et 72 ans, ce qui est en parfaite concordance avec la littérature [7–9]. La prédominance masculine notée dans différentes séries de la littérature (sex-ratio H/F proche de 1,4) [10] est vérifiée dans notre série (sex-ratio = 1,7). À ce jour, les causes du MM ne sont pas encore totalement élucidées. Le seul facteur de risque clairement identifié est l'exposition aux radiations ionisantes. Les pesticides utilisés dans les professions agricoles ont été aussi incriminés. Il existe des cas familiaux, faisant discuter des facteurs génétiques [1,10]. Dans notre étude, l'exposition à des produits chimiques tels que les pesticides et le tabac sont les principaux facteurs de risque retrouvés. Les douleurs osseuses représentent la circonstance de découverte la plus fréquente dans notre série (74,1 % des cas). Dans une autre étude tunisienne, les douleurs osseuses constituent 60 % des signes d'appels du MM [11]. L'insuffisance rénale est une complication retrouvée avec une fréquence de 19 % dans notre étude. Des fréquences comparables (22 % et 31 %) ont été trouvées dans deux grandes séries [12,13].

Les lésions radiologiques ont été observées dans 78 % des cas. Elles sont dominées par les ostéolyses localisées principalement au niveau du crâne et du bassin, suivies par les tassements vertébraux et les compressions médullaires. Ces différentes lésions radiologiques ont été rapportées par la plupart des auteurs et constituent les signes radiologiques très classiques du MM [2,8,11].

Sur le plan biologique, la vitesse de sédimentation (VS) est souvent élevée (> 50 mm), ce phénomène est directement lié à la présence de la protéine monoclonale. La VS peut être normale, dans les cas de MM à chaînes légères, ou non sécrétant, ou lorsque la protéine monoclonale se comporte comme une cryoglobuline et précipite à basse température [7]. Dans notre série, tous nos patients ont une VS accélérée dont 77,6 % des cas supérieure à 100 mm. L'anémie est la manifestation hématologique la plus fréquente au cours du MM. Elle est présente chez 87 % de nos patients et sévère (hémoglobine $< 8,5$ g/dL) dans un tiers des cas. Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés dans d'autres études multicentriques. Toutefois, le degré de sévérité de l'anémie diffère d'une étude à une autre [14,16]. Cela pourrait être expliqué par la diversité des mécanismes physiopathologiques de l'anémie qui sont intriqués. L'anémie résulte principalement d'une insuffisance médullaire liée à l'infiltration de la moelle osseuse par des cellules plasmocytaires malignes, d'un phénomène d'hémodilution lié à l'hyperprotéïnémie et de la diminution de la sécrétion de l'érythropoïétine (EPO) consécutive à une insuffisance rénale [15]. La leucopénie et la thrombopénie sont rares (8–10 %) mais aggravent le pronostic, reflétant une importante masse tumorale [15]. Dans notre série, ces anomalies sont relativement fréquentes. En effet, une neutropénie et une thrombopénie ont été respectivement retrouvées chez 14,8 % et 33,34 % de nos patients. Ce qui peut aussi expliquer en partie la faible médiane de survie de notre population.

Le myélogramme constitue une étape décisive dans la démarche diagnostique du MM, il permet de mettre en évidence une infiltration plasmocytaire anormale quantitativement et qualitativement. Une infiltration plasmocytaire supérieure à 30 % constitue un critère majeur de diagnostic du MM alors qu'une plasmocytose entre 10 à 30 % constitue un critère mineur selon les critères de diagnostic du SWOG mais d'autres critères ont été récemment établis par le consensus (International Myeloma Working Group IMWG 2009). Ces critères distinguent le MM symptomatique (plasmocytose médullaire supérieure à 10 %, présence dans le sérum ou les urines d'une protéine monoclonale et présence d'une atteinte organique pouvant être attribuée à la prolifération), le myélome multiple asymptomatique et les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) [1].

La présence d'anomalies morphologiques, de plasmocytes dystrophiques ou de formes immatures constitue aussi un élément important pour le diagnostic. Dans notre étude, le diagnostic du MM est retenu pour les 27 patients ayant une infiltration plasmocytaire supérieure à 30 %. Pour une infiltration entre 10 à 30 %, le diagnostic cytologique du MM est posé chez huit patients sur 14. L'infiltration plasmocytaire est faite de plasmocytes normaux et dystrophiques. Pour les six autres cas, il s'agit d'une infiltration

plasmocytaire et lymphoplasmocytaire ce qui a posé le diagnostic différentiel avec les autres gammopathies monoclonales. La BOM a confirmé le diagnostic du MM pour cinq cas et a posé le diagnostic de la maladie de Waldenström pour un cas. Pour les 13 cas où l'infiltration plasmocytaire est inférieure à 10% (huit cas de moelle de richesse faible non concluante, cinq cas d'infiltration plasmocytaire normale), aucun diagnostic cytologique du MM n'a été posé. Le recours à la BOM était indispensable et la présence d'infiltration plasmocytaire maligne a été confirmée dans huit cas sur 13.

L'EP a montré un pic monoclonal dans 75,9% des cas : 65,8% dans la zone des gamma-globulines, 19,5% dans la zone des β -globulines et 14,6% dans la zone des α -globulines. Nos résultats sont similaires à ceux de l'étude de Kyle et al. [17] où un pic monoclonal a été détecté chez 82% des patients. L'EP est normale chez sept patients dont deux cas de MM à chaînes légères. Ces résultats témoignent du manque de sensibilité de l'EP pour la détection des gammopathies monoclonales notamment pour le MM à chaînes légères d'où l'intérêt de compléter l'EP par une immunoelectrophorèse et/ou une IF ce qui permet de déterminer l'isotype de la protéine monoclonale [16,18]. Nous avons observé une prédominance du type IgG (61,8% des cas), suivi des IgA (29,4% des cas), deux cas de MM à chaînes légères (5,9% des cas) et un cas d'IgM (2,9% des cas). Aucun cas du MM à IgD n'a été détecté. Vu la rareté du MM à IgM, le diagnostic différentiel avec la maladie de Waldenström s'est posé. Ce diagnostic a été confirmé par l'augmentation du taux des IgM (> 5 g/L), l'infiltration lymphoplasmocytaire et l'apparition d'adénopathies. Dans notre série, la répartition des isotypes d'immunoglobulines et des chaînes légères est proche de celle rapportée par d'autres séries : IgG (73%) et IgA (11%) [17].

En se basant sur les critères diagnostiques du SWOG, le diagnostic positif du MM a été retenu pour 48 patients sur 54 hospitalisés pour suspicion de MM. En effet, la présence d'une plasmocytose médullaire ou d'un pic monoclonal n'est pas toujours synonyme de MM. Il est donc important de faire le diagnostic différentiel avec les autres types de gammopathies monoclonales et les plasmocytoses réactionnelles secondaires à une infection virale, une maladie auto-immune ou à certains cancers.

La classification de Salmon et Durie a été la méthode de référence pour l'évaluation du pronostic. Elle permet d'apprécier la masse tumorale en fonction du taux des composants monoclonaux et la cotation des lésions osseuses. Tous nos patients sont classés stade III dont 65,5% stade IIIa et 34,5% stade IIIb. Dans l'étude de Chombart et al. [19] les cas de MM étaient classés comme suit : 30,4% stade I, 38,5% stade II et enfin 31,1% stade III. Dans notre étude, cette prédominance du stade III au moment du diagnostic est expliquée par le retard de consultation et de diagnostic pour la majorité de nos patients. La β 2-microglobuline et la CRP sont des facteurs pronostiques indépendants liés à la masse tumorale. Il existe une corrélation entre leurs taux et la survie dans le MM ce qui a permis d'établir une classification en groupes de gravité différente : un groupe à faible risque avec une CRP et une β 2-microglobuline inférieure à 6 mg/L, un groupe à risque intermédiaire avec une CRP ou une β 2-microglobuline supérieure ou égale à 6 mg/L et un groupe à haut risque avec une CRP et une β 2-microglobuline supérieure ou égale à 6 mg/L. Les taux

de survie dans ces trois groupes sont respectivement de 54, 27 et six mois [18,20]. Dans notre étude, 17 patients (35,4%) ont une CRP supérieure ou égale à 6 mg/L dont 14 patients (29,2%) ont une β 2-microglobuline supérieure ou égale à 6 mg/L. Nos résultats sont comparables à ceux de Chombart et al. où les taux de CRP et de la β 2-microglobuline supérieure ou égale à 6 mg/L étaient respectivement retrouvés dans 43,6% et 27,7% des cas. Actuellement, il existe un consensus de l'IMWG (2009) concernant les paramètres pronostiques à analyser au moment du diagnostic du MM. Selon ce consensus, l'évaluation pronostique du MM doit comporter la β 2-microglobuline et le taux d'albuminémie pour définir l'*international staging system* (ISS) et une analyse cytogénétique des plasmocytes par la technique FISH (*fluorescent in situ hybridization*) [1,18,21]. Selon ISS, 28,6% de nos patients sont de classe III (médiane de survie de 29 mois) et 13,5% sont de classe I (médiane de survie de 62 mois). L'étude cytogénétique fait surtout appel à la recherche de la délétion du chromosome 13 par la méthode interphase FISH. Dans l'étude de Fonseca et al., cette délétion a été retrouvée chez 54% des patients [22,23]. Dans notre travail, on a pu décrire des anomalies structurales (trois cas) impliquant les chromosomes 9 et 16 ainsi qu'une translocation t(5,7) et des anomalies numériques (trois cas d'hyperploïdie) mais aucun cas de délétion du chromosome 13 n'a été détecté. La morphologie des plasmocytes constitue aussi un facteur pronostique avec le caractère péjoratif du type plasmoblastes [24]. La présence de plasmoblastes a été signalée dans neuf cas et elle est associée à une médiane de survie très courte de six mois.

Le MM multiple reste une maladie incurable, toutefois sa prise en charge a connu des progrès thérapeutiques récents. Le traitement par Melphalan-Prednisone (40,7% de nos patients ont bénéficié de ce traitement) est resté pendant longtemps le traitement de référence du myélome chez les sujets de plus de 65 ans avec 53% de patients répondeurs. Les combinaisons de chimiothérapies ont permis d'obtenir un meilleur pourcentage de répondeurs mais sans amélioration en termes de survie. L'utilisation des nouveaux agents (bortézomib, thalidomide et lénalidomide) a permis d'améliorer les réponses et notamment le taux de rémission complète avant la procédure d'intensification. Pour les patients âgés de moins de 65 ans, l'autogreffe de cellules souches périphériques suivie d'une chimiothérapie est actuellement le traitement de référence et elle est souvent précédée par un traitement d'induction par le vincristine-adriamycine-dexaméthasone [25]. Dans notre population, nous avons obtenu uniquement trois cas de rémission complète mais qui ont rechuté après une moyenne de dix mois. Quatorze patients avaient obtenu une rémission partielle avec une persistance des douleurs osseuses et nous avons noté cinq cas de décès avec une médiane de survie de deux mois. La médiane de survie globale de notre population est de dix mois. Elle est nettement plus courte que celle retrouvée dans l'étude de Chambart où la médiane de survie était de 34 mois [19].

Conclusion

Le MM est une gammopathie monoclonale de diagnostic le plus souvent facile fondé sur la présence d'une infiltration

plasmocytaire médullaire maligne, d'un pic monoclonal et d'une atteinte organique pouvant être attribuée à la prolifération plasmocytaire. En revanche, la prise en charge des patients atteints de MM devient complexe, faisant intervenir de nombreux paramètres pronostiques, thérapeutiques et de surveillance. Elle nécessite une meilleure compréhension de l'hétérogénéité du profil évolutif de la maladie pour chacun des patients.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Manier S, Leleu X. Myélome multiple : diagnostic clinique et perspective de traitement. Recommandations de l'International Myeloma Working Group (IMWG). *Immunoanal Biol Spec* 2011;26:125–36.
- [2] Facon T, Yacoub-Agha I, Leleu X. Myélome multiple. *EMC hématologie* 2003, 13-014-E-10:15p].
- [3] Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23:3–9.
- [4] Van Marion AMW, Lokhorst HM, Van Den Tweel JG. Pathology of multiple myeloma. *Current Diagn Pathol* 2003;9:322–7.
- [5] Rajkumar SV, Buadi F. Multiple myeloma: New staging systems for diagnosis, prognosis and response evaluation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(4):665–80.
- [6] Grosbois B. Gammopathie monoclonale et myélome multiple : quelles nouveautés ? quelles perspectives ? *Revu Med Interne* 2007;28:667–9.
- [7] Raab MA, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374:324–39.
- [8] Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc* 1975;50:29–40.
- [9] Zappasodi P, Corso A, Klersy C, Pica G, Mangiacavalli S, Varettoni M, et al. Changes in multiple myeloma epidemiology in the last thirty years: a single centre experience. *Eur Journal Cancer* 2006;42:396–402.
- [10] Kyle RA, Rajkumar SV. Epidemiology of the plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(4):637–64.
- [11] Makni S, Zouari R, Barbouch MR, Ayed K, Moalla M, Zakraoui L. Gammopathies monoclonales en Tunisie. *Rev Fr Transfus Hem* 1990;33:31–8.
- [12] Blade J, Fernandez-Lama P, Bosch F, Montoliu J, Lens XM, Montoto S, et al. Renal failure in multiple myeloma: presenting features and predictors of outcome in 94 patients from a single institution. *Arch Intern Med* 1998;158:1889–93.
- [13] The Nordic Myeloma Study Group Knudsen LM, Hippe E, Hjorth M, Holmberg E, Westin J. Renal function in newly diagnosed multiple myeloma: ademographic study of 1353 patients. *Eur J Haematol* 1994;53:207–12.
- [14] Kyle RA, Gertz MA, Witzig TA, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78:21–33.
- [15] Bladé J, Rosinol L. Renal hematologic and infectious complications in multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(4):635–52.
- [16] Bartl R, Frisch B. Diagnostic morphology in myeloma multiple. *Current Diagn Pathol* 1995;2:222–35.
- [17] Kyle RA. Sequence of Testing for Monoclonal Gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123(2):114–8.
- [18] Harousseau JL. Ten years of improvement in the management of multiple myeloma: 2000–2010. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2010;10(6):424–42.
- [19] Chombart B, Gagneux-Lemoussu L, Eschard JP, Ackah-Miezan S, Novella JL, Brochot P. Facteurs pronostiques du myélome utilisables en pratique courante : suivi sur dix ans de 148 malades âgés de plus de 55 ans. *Rev Rhu* 2005;72:1299–305.
- [20] Bataille R, Boccadoro M, Klein B, Durie BGM, Pileri A. C-reactive protein and serum beta 2-microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. *Blood* 1992;80:733–7.
- [21] Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412–20.
- [22] Bernasconi P, Cavgliano PM, Boni M, Astori C, Calatroni S, Giard, et al. Long-term follow up with conventional cytogenetics and ban 13q14 interphase–metaphase in situ hybridisation monitoring monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Br J Haematol* 2002;118:545–9.
- [23] Shaughnessy Jr, Tian E, Sawyer J, Bumm C, Landes R, Badros A, et al. Incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000;96(4):1505–11.
- [24] Murakami H, Nemoto K, Sawamura M, Tamura J, Matsushima T, Naruse T, et al. Prognostic relevance of morphological classification in multiple myeloma. *Acta Haematol* 1992;87:113–7.
- [25] Hulin C. Les nouveaux médicaments du myélome. *Rev Med Interne* 2007;28:682–8.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Prévalence du phénotype Rh D faible chez les donneurs de sang Rh D négatif au Maroc

Weak D prevalence among Rh D negative blood donors in Morocco

Z. Kabiri^{a,*,b}, M. Benajiba^a, K. Hajjout^c, N. Dakka^b, H. Bellaoui^b

^a Centre national de transfusion sanguine, Madinat Al Irfane, BP 180, 10000 Rabat, Maroc

^b Faculté des sciences, université Mohammed-V, BP 1014, 10000 Rabat, Maroc

^c Centre régional de transfusion sanguine, Madinat Al Irfane, BP 180, 10000 Rabat, Maroc

Reçu le 18 juillet 2012 ; accepté le 30 septembre 2012

KEYWORDS

Rhesus system;
Rh D;
Weak D;
Prevalence;
Blood donor;
Monoclonal anti-D

MOTS CLÉS

Système rhésus ;
Rh D ;
Rhésus D faible ;
Prévalence ;
Donneur de sang ;
Anti-D monoclonal

Summary

Aim of the study. – In this study, we tried to estimate the prevalence of weak D in Moroccan population, based on the serological techniques.

Materials and methods. – This study was conducted in the National Center of Transfusion sanguine of Rabat, from 01 January 2011 to 30 June 2011. During this period, a total of 23,098 donors were typed for rhesus D antigen at PK 7300 Olympus. Those who tested negative for rhesus D antigen were further subjected to weak D testing.

Results. – In this study, 0.9% of the donors were rhesus negative and the weak D phenotype was detected in about 0.4%.

Conclusion. – The finding of 0.4% prevalence of weak D phenotype among donors in this study is concordant to those found in Caucasians (0.2% to 1%).

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

But de l'étude. – L'objectif de cette étude est la détermination de la prévalence du phénotype Rhésus D faible dans la population marocaine, en se basant sur des techniques sérologiques.

Matériel et méthode. – Cette étude a été réalisée sur des donneurs de sang colligés au Centre national de transfusion sanguine de Rabat du 1^{er} janvier 2011 au 30 juin 2011. Durant cette période, 23 098 donneurs ont été testés pour l'antigène D en utilisant l'automate Olympus PK 7300. Ceux qui sont testés Rh D négatif ont été également soumis à des tests D faible.

Résultats. – Dans cette étude, 9,5% des donneurs ont été typés Rhésus D négatif et 0,4% ont été détectés Rhésus D faible.

Conclusion. – La prévalence du phénotype Rhésus D faible estimée dans cette étude (0,4%) est concordante à celle rapportée chez les caucasiens (0,2 à 1%).

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : kabiri_zh@yahoo.com (Z. Kabiri).

Introduction

Le système Rhésus (Rh) est, du point de vue clinique, le deuxième plus important système sanguin derrière le système ABO. Il s'agit également du plus polymorphique des groupes sanguins. Il a été décrit pour la première fois en 1940 par Landsteiner et Wiener. Le premier antigène du système Rh découvert a été appelé D et l'anticorps correspondant, anti-D. Ainsi la classification des individus dits Rh positif et Rh négatif est déterminée par la présence ou l'absence de la protéine D fortement immunogène à la surface des hématies.

Le phénotype D faible (que l'on appelait anciennement D^u) se caractérise par l'expression affaiblie de l'antigène D à la surface des globules rouges qui ne s'agglutinent directement qu'avec certains réactifs anti-D ou seulement après la phase de contact avec l'antiglobuline de l'analyse, d'où il est absolument impératif de dépister l'antigène D faible et de le considérer comme positif, car il est immunogène. Cela explique le fait que certaines personnes peuvent être déterminées comme Rhésus D (Rh D) positif en tant que donneur de sang et Rh D négatif en tant que patient susceptible d'être transfusé.

La fréquence du phénotype D faible varie avec la méthode utilisée, le réactif utilisé et la population raciale testée. Chez les caucasiens, elle est d'environ 0,2 à 1%, alors que dans la race noire elle est beaucoup plus élevée (4,6 % à 7 %) [1–3].

L'objectif de cette étude est d'estimer la prévalence du phénotype Rh D faible dans la population marocaine en utilisant les résultats des techniques sérologiques.

Matériel et méthode

Matériel

Ce travail porte sur 23 098 donneurs de sang recrutés du 1^{er} janvier 2011 au 30 juin 2011 au Centre national de transfusion sanguine de Rabat.

Méthode

Le typage ABO–Rh D des donneurs de sang est réalisé sur un automate Olympus PK7300 en utilisant deux lots de réactifs différents d'anticorps anti-D monoclonaux :

- Seraclone anti-D Blend (IgM [cloneBS232] + IgG [cloneBS221 et H41 11B7]) ;
- Diagaste Anti-D TOTEM (P3 × 61 + P3 × 21223B10 + P3 × 290 + P3 × 35).

Les échantillons qui ont été typés Rh négatif avec les deux réactifs anti-D ont été soumis au test D faible, en utilisant la technique de Combs indirect à l'antiglobuline humaine polyvalente. Cela consiste à déposer dans un tube à hémolyse :

- 50 µL de sérum anti-D Blend (IgM [cloneBS232] + IgG [cloneBS221 et H41 11B7]) ;
- 50 µL de suspension à 5 % des hématies à tester.

Laisser le tout en contact 15 minutes à 37 °C, puis laver trois fois avec la solution saline à 0,9 %, ensuite aspirer le dernier surnageant et ajouter 100 µL d'antiglobuline, remettre les hématies en suspension puis centrifuger une minute à 1000 tours par minute et lire le résultat en agitant légèrement : l'agglutination témoigne de la présence de l'antigène D faible.

Chaque prélèvement donnant une réaction douteuse ou difficilement lue au test D faible est soumis par la suite au test de fixation–élution, spécifique de la détection de l'antigène D faible type *Del* qui représente la forme extrême du phénotype D faible.

Résultats

Sur un total de 23 098 donneurs de sang : 20 894 (90,5 %) ont été typés Rh D positif et 2 204 (9,5 %) ont été typés Rh D négatif (Tableau 1).

Par la suite, tous les échantillons Rh D négatif (2 204) ont été soumis au test D faible et, par conséquent, les résultats suivants ont été trouvés :

- dix échantillons (0,4 % par rapport au 2 204) ont été jugés Rh D faible positif dont dans un cas il s'agit d'un D faible type *Del* confirmé par le test de fixation–élution ;
- 2 194 échantillons (99,6 % par rapport au 2 204) ont donné un résultat D faible négatif au test de Combs indirect à l'antiglobuline humaine polyvalente (Tableau 1).

Discussion

Le Rh D faible, précédemment appelé D^u, a été l'objet de nombreuses études depuis qu'il a été identifié [4]. Dans notre étude, la valeur obtenue de la prévalence des donneurs Rh D négatif (9,5 %) et celle des donneurs Rh D positif (90,5 %) dans la population marocaine sont en concordance avec celle rapportée dans la littérature (5 % à 15 % Rh D négatif et 85 % à 95 % Rh D positif) [1–3, 5].

Par rapport à la totalité des donneurs étudiés (23 098), la prévalence du phénotype D faible est de 0,04 % et de 0,4 % par rapport aux donneurs Rh D négatif (2 204). Ces valeurs s'accordent avec l'incidence rapportée chez les caucasiens (0,2 à 1 %) [1, 2]. Par ailleurs, des valeurs légèrement inférieures (0,13 %) ont été rapportées chez les Coréens et les Indiens (1, 3) et d'autres plus élevées (4,6 %) ont été obtenues chez les Africains au Ghana [3].

Cette variabilité de la prévalence d'une région à l'autre dépend de plusieurs facteurs : des performances du réactif, de la méthode utilisée et du mélange racial de la population testée [6].

Dans notre étude, l'incidence de 0,4 % de D faible est minime par rapport à celle qui peut être estimée en utilisant la technique manuelle pour le typage Rh D. En effet avec l'automate Olympus PK7300, la sensibilité du réactif anti-D est améliorée grâce à la phase d'incubation de 60 minutes. Par conséquent, la majorité des Rh D faibles qui ont une densité de site antigénique élevée sont automatiquement de types Rh D positif [7].

La principale préoccupation de ce phénotype Rh D faible se pose en raison de deux facteurs qui sont :

Tableau 1 Résultats du typage de l'antigène D chez les donneurs de sang marocains.

Total des donneurs	Rh D positif	Rh D négatif	Rh D faible positif	Rh D faible négatif
23 098	20 894	2204	10	2194
Fréquence (%)	90,5	9,5	0,4	99,6

Sur un total de 23 098 donneurs de sang : 20 894 donneurs ont été typés Rhésus D positif (90,5 %) ; 2204 donneurs ont été typés Rhésus D négatif (9,5 %). Parmi ces 2204 donneurs Rh D négatif : dix donneurs (0,4 %) ont été détectés Rh D faible positif et 2194 donneurs (99,6 % par rapport au 2204 Rh D négatif) ont été révélés Rh D faible négatifs au test D faible en Combs indirect à l'antiglobuline humaine polyvalente.

- d'une part, les difficultés immunohématologiques de typage de l'antigène D faible, rencontrées avant l'utilisation des réactifs monoclonaux, où les résultats des groupes sanguins ont été affectés par le titre des anticorps anti-D dans le réactif utilisé. Dans ce cas, la personne ayant l'antigène D faible peut être étiquetée Rh D positif par un laboratoire et Rh D négatif par un autre. Ces résultats contradictoires peuvent conduire à un accident transfusionnel ;
- d'autre part, il y a le risque d'allo-immunisation chez les destinataires Rh D négatif lié à l'antigène D qui est hautement immunogène et donc il est impératif que les sujets ayant le phénotype D faible soient considérés D positif en tant que donneurs, et D négatif comme receveurs. Par conséquent, ils doivent impérativement être transfusés avec du sang Rh D négatif.

De même, pour le cas des mères Rh D négatives porteuses d'un fœtus D faible, elles doivent obligatoirement recevoir l'immunoprophylaxie Rh [8], car le passage des globules rouges du fœtus à la mère peut causer une sensibilisation anti RhD.

Conclusion

L'incidence du Rh D faible est variable dans le monde. Elle est de 0,2 à 1 % dans la population blanche [1,2]. Dans notre étude, l'incidence de phénotype Rh D faible chez les donneurs Rh D négatif marocains a été calculée à 0,4 %, valeur qui est concordante avec ce qui est rapporté chez les caucasiens. Il est possible que le typage sérologique Rh D sur automate Olympus PK7300 avec l'utilisation des anticorps monoclonaux anti-D puisse expliquer le taux bas de notre incidence du Rh D faible par rapport à celle estimée chez les sujets de race noire. Pour conclure, le Rh D faible présente une situation clinique particulière délicate. Le typage Rh D ne serait confirmé que par le typage moléculaire. Cette certitude est indispensable pour pouvoir prévenir aussi bien le

risque potentiel de formation d'allo-anticorps chez un receveur Rh D négatif lorsqu'il est transfusé avec du sang Rh D faible non identifié, comme tel que l'allo-immunisation des femmes Rh D négatif classées à tort comme Rh D positif en âge de procréer.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Kim JY, Kim SY, Kim CA, Yon GS, Park SS. Molecular characterization of D-Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion* 2005;45:345–52.
- [2] Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lublin DM. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 1993;82:651–5.
- [3] Opoku-Okrah C, Amidu N, Amoah-Sakyi S. Detection of weak d (D^u) phenotype among Rh-D negative males and females in Kumasi, Ghana. *J Sci Technol* 2008;28(3):34.
- [4] Wagner FF, Frohmajer A, Ladewing B, Eicher NI, Lonicier CB, Muller TH, et al. Weak D allele express distinct phenotype. *Blood* 2000;95:2699–709.
- [5] Makroo N, Vimarsh R, Chowdhry M, Bhatia A, Gupta R, Rosamma NL. Weak D prevalence among Indian blood donors. *Asian J Transfus Sci* 2010;4(2):137–9.
- [6] Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008;48:473–8.
- [7] Jenkins CM, Johnson ST, Bellissimo DB, Gottschall JL. Incidence of weak D in blood donors typed as D positive by the Olympus PK 7200. *Immunohematology* 2005;21(4):152–4.
- [8] Mayne K, Bowell P, Woodward T, Sibley C, Lomas C, Tippet P. Rh immunization by the partial D antigen of category DVa. *Br J Haematol* 1990;76:537–9.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens

Evaluation of oxidative stress among coronary patients

I. Gammoudi^{a,*}, A. Dandana^a, H. Chahed^a, S. Ferchichi^a, S. Ernez^b, A. Miled^a

^a Laboratoire de biochimie, CHU Farhat Hached, rue Docteur-Moreau, 4000 Sousse, Tunisie

^b Service de cardiologie, CHU Farhat Hached, Sousse, Tunisie

Reçu le 15 septembre 2012 ; accepté le 5 octobre 2012

KEYWORDS

Coronary syndrome;
Homocysteine;
Oxidant;
Antioxidant;
Free radical

MOTS CLÉS

Syndrome
coronarien ;
Homocystéine ;
Oxydant ;
Antioxydant ;
Radical libre

Summary

Objective. – The present study was undertaken to evaluate the variation of the parameters of antioxidant and oxidant status in coronary patients.

Patients and methods. – Two hundred and eighteen patients with unstable angina (UA) and 183 healthy control subjects were admitted. Oxidant status was evaluated by measuring homocysteine and thiobarbituric reactive oxygen substances (TROS). Antioxidant status was evaluated by measuring superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione peroxidase (GPx).

Results. – Homocysteine (Hcy) and thiobarbituric acid reactive substances (TROS) levels were significantly higher in coronary patients compared with healthy control subjects. SOD and GPx were significantly decreased among patients compared to the controls. In addition, coronary patients showed significant negatives correlations between Hcy–SOD, Hcy–GPx and TBARS–SOD, TBARS–GPx.

Conclusion. – Our patients present an increasing oxidative stress but the defences antioxidants tended to be decreased.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Objectif. – Cette étude a été menée afin d'évaluer la variation des paramètres du statut antioxydant et oxydant chez des patients coronariens.

Patients et méthodes. – Deux cent dix-huit patients présentant un angor instable (AI) et 183 sujets témoins ont constitué la population d'étude. Les paramètres mesurés étaient : l'homocystéine (Hcy), les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (SRATB), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx).

Résultats. – Notre étude a montré chez les patients coronariens une élévation statistiquement significative de l'Hcy et du taux des SRATB. Les activités antioxydantes étaient

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : maynou_gam@yahoo.fr (I. Gammoudi).

significativement diminuées. Nous avons noté des corrélations négatives statistiquement significatives entre les paramètres du stress oxydant (Hcy et SRATB), d'une part, et les paramètres du statut antioxydant (GPx et SOD), d'autre part.

Conclusion. — Cette étude montre clairement la réduction significative du système antioxydant avec l'augmentation concomitante des paramètres du statut oxydant chez les patients coronariens.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La pathologie coronaire constitue un problème majeur de santé publique de part sa fréquence, sa morbi-mortalité et ses répercussions socioéconomiques [1]. Les syndromes coronariens aigus sans sus-décalage du segment ST (SCA [ST-]), qui regroupent l'angor instable (AI) et l'infarctus du myocarde sans onde Q (IDM) sont considérés comme une cause fréquente d'hospitalisation en unités de soins intensifs cardiologiques avec un risque de décès d'environ 5% en période d'hospitalisation [1,2].

En outre, l'athérosclérose coronaire constitue la principale étiologie commune des SCA [3–5]. Plusieurs facteurs de risque lui ont été associés, notamment l'hyperhomocystéinémie [6,7].

Bien que l'homocystéine (Hcy) soit un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose, elle est considérée comme étant un facteur pro-oxydant largement impliqué dans la genèse d'un stress oxydant [6,8].

Le stress oxydant se produit lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les défenses antioxydantes, ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires [9,10].

Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il constitue un terrain favorable au développement de diverses pathologies notamment les maladies cardiovasculaires [11]. Ainsi, l'implication du stress oxydatif dans la genèse et la progression de l'AI chronique a été suggérée [12,13].

Dans ce cadre, l'objectif de notre étude était d'évaluer la variation de l'homocystéinémie, du taux des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique, de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx) chez des coronariens tunisiens, d'une part, et de vérifier les corrélations qui existent entre ces différents paramètres, d'autre part.

Patients et méthodes

Patients

Notre étude a porté sur 218 patients coronariens hospitalisés pour AI (131 hommes et 87 femmes) d'âge moyen $51,3 \pm 12$ ans. Ils étaient suivis dans le service de cardiologie du CHU Farhat Hached, Sousse.

Cent quatre-vingt-trois sujets (122 hommes et 61 femmes) d'âge moyen $46,2 \pm 13,7$ ans et qui sont indemnes de toutes pathologies cardiaque et hépatique, constituaient le groupe témoin.

Une fiche de renseignements a été établie pour chaque individu pour déceler les facteurs de risque. Les critères d'exclusion étaient : maladies inflammatoires, cancer, pathologies hépatiques, infections bactériennes et traumatismes.

Chaque participant (patient ou témoin) a signé un consentement éclairé.

Méthodes

Les prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de la veine du pli de coude. Le sang prélevé sur un tube contenant l'EDTA était utilisé pour le dosage de l'hémoglobine (Hb). Un tube hépariné était utilisé pour l'exploration des paramètres du statut antioxydant (SOD, GPx). Le sang prélevé sur tube sans anticoagulant était utilisé pour la détermination des paramètres du statut oxydant (Hcy, SRATB).

Le dosage de l'Hcy a été réalisé par une méthode immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA-AXym-Abbott-Wiesbaden, Allemagne).

Les SRATB ont été déterminées par une méthode fluorimétrique qui repose sur la formation d'un pigment en milieu acide et à chaud entre les SRATB et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). Ce pigment est extractible par les solvants organiques.

L'activité érythrocytaire de la SOD a été déterminée par une méthode enzymatique colorimétrique à la xanthine oxydase (Randox, Antrim, Royaume-Uni). L'activité de la GPx a été effectuée par une méthode enzymatique à 340 nm (Randox, Antrim, Royaume-Uni).

Nous avons utilisé le logiciel SPSS version 11.0 pour les calculs et la comparaison des moyennes.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type ($x \pm \sigma$). Le seuil de significativité a été fixé à 5% ($p < 0,05$).

Résultats

Les taux des paramètres du statut oxydant sont présentés dans le **Tableau 1**. Nous avons noté une

Tableau 1 Variation des paramètres du statut oxydant chez les patients et les témoins.

Population	Patients (n = 218)	Témoins (n = 183)	p
Paramètres			
Hcy (μ mol/L)	$20,55 \pm 9,83$	$8,22 \pm 2,51$	$< 10^{-3}$
SRATB (μ mol/L)	$1,68 \pm 0,66$	$0,81 \pm 0,31$	$< 10^{-3}$

Hcy : homocystéine ; SRATB : substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique.

Tableau 2 Variation des paramètres du statut antioxydant chez les patients et les témoins.

Population	Patients (n = 218)	Témoins (n = 183)	p
Paramètres			
SOD (U/g Hb)	901,97 ± 359,042	1406,6 ± 590,66	< 10 ⁻³
GPx (U/g Hb)	48,98 ± 9,26	110,18 ± 28,27	< 10 ⁻³

SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase.

Tableau 3 Corrélations entre les paramètres du statut oxydant et antioxydant.

	SOD	GPx
<i>Hcy</i>		
<i>r</i>	-0,647	-0,644
<i>p</i>	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³
<i>SRATB</i>		
<i>r</i>	-0,662	-0,673
<i>p</i>	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³

Hcy : homocystéine ; SRATB : substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique ; SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase.

hyperhomocystéinémie chez nos patients coronariens tabagiques par rapport aux témoins.

Dans notre étude, nous avons noté également une augmentation statistiquement significative du taux des SRATB chez les patients comparés aux témoins.

Les paramètres du statut antioxydant étaient effondrés chez nos patients comparés aux témoins. En effet, nous avons noté une diminution statistiquement significative des activités érythrocytaires des enzymes antioxydantes présentées par la SOD et la GPx chez les coronariens comparés aux témoins (Tableau 2).

Nous avons également trouvé des corrélations entre les différents paramètres du stress oxydant chez nos patients coronariens. En effet, nous avons remarqué une corrélation positive statistiquement significative entre l'Hcy et les SRATB ($r=0,875$; $p<10^{-3}$).

La corrélation entre l'activité de la SOD et la GPx est positive statistiquement significative ($r=0,612$, $p<10^{-3}$).

En revanche, nous avons noté des corrélations négatives statistiquement significatives entre les paramètres du stress oxydant (Hcy et SRATB), d'une part, et les paramètres du statut antioxydant (GPx et SOD), d'autre part (Tableau 3).

Discussion

Bien que l'Hcy soit un facteur de risque indépendant de l'athérosclérose, elle est considérée comme étant un facteur pro-oxydant largement impliqué dans la genèse d'un stress oxydant [6,14].

En effet, des concentrations élevées en Hcy provoquent une atteinte des cellules endothéliales (CE) par la diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO[•]) et affecte ainsi la vasomotricité dépendante de l'endothélium. Cet effet néfaste d'hyperhomocystéinémie s'explique par la formation du peroxynitrite (ONOO[•]) très toxique, généré

lors de la réactivité du NO[•] avec l'anion superoxyde (O₂^{•-}) [6,15–17].

En outre, Cheng et al. [18] ont démontré que l'homocystéine présente des propriétés pro-inflammatoires (stimulation des Il-1, des Il-6 et des Il-8) à la fois vis-à-vis des CE et des cellules musculaires lisses. Elle augmente l'adhésion et la transmigration des leucocytes en stimulant l'expression de molécules d'adhésion et en diminuant la production de NO[•] au niveau endothélial.

Par ailleurs, des études ont montré qu'une hyperhomocystéinémie entraîne une baisse de l'activité de la GPx des CE, augmentant ainsi la teneur intracellulaire en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en peroxydes organiques et en peroxy-nitrite qui sont habituellement détruits par la GPx [6]. Par conséquent, l'hyperhomocystéinémie peut favoriser la production des radicaux hydroxyles, initiateurs connus de la peroxydation lipidique [8].

Dans notre étude, l'élévation du taux des SRATB chez nos patients coronariens reflète le degré de peroxydation lipidique myocardique. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature [19–21].

Dubois-Rande et al. ont suggéré que le degré de l'altération oxydative du myocyte observée lors de l'AI est proportionnel aux taux des SRATB. Par conséquent, la variation de la concentration des MDA peut être utilisée comme un marqueur pronostique [21–23]. D'ailleurs, Holvet et al. ont souligné que des taux élevés des SRATB sont associés à la sévérité des SCA [19].

Plusieurs auteurs ont proposé que l'hyperhomocystéinémie et la peroxydation lipidique jouent un rôle important dans la genèse du processus athéromateux et les maladies cardiovasculaires [15,21]. Dans notre étude, les patients souffrant d'un AI présentaient une élévation concomitante de l'Hcy et des SRATB, ce qui constitue un reflet indirect de la potentialisation des effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène (ERO) produits lors de l'ischémie et de l'auto-oxydation de l'Hcy.

En effet, l'auto-oxydation de l'Hcy est à l'origine de la production des ERO dont la cible privilégiée est les acides gras polyinsaturés des LDL. Les LDL-ox seront à l'origine des événements cellulaires et moléculaires intervenant dans le développement des lésions athéromateuses [6,14,24].

Par ailleurs, notre étude a révélé une corrélation positive statistiquement significative entre la SOD et la GPx. Nos résultats ne diffèrent pas des autres études [25,26]. En effet, la SOD catalyse la dismutation de l'O₂^{•-} en H₂O₂. Elle permet également d'éviter la formation de dérivés plus toxiques comme le ONOO[•], médiateur important de la peroxydation lipidique et la nitration protéique [9,23]. Les GPx réduisent les peroxydes d'hydrogènes et les hydroperoxydes respectivement en eau et en alcool en radical hydroxyl (OH[•]) [27,28]. Cependant, ces effets bénéfiques de ces enzymes antioxydantes sont absents lors de l'AI, ce qui corrobore nos hypothèses.

D'ailleurs, des corrélations négatives statistiquement significatives entre les SRATB et les enzymes antioxydantes (SOD et GPx) ont été montrées dans notre étude. Ainsi, Motghare et al. [29] ont prouvé que la peroxydation lipidique est exagérée au cours de l'ischémie myocardique, avec une diminution concomitante en enzymes antioxydantes, notamment la GPx [29,30].

En outre, les corrélations négatives statistiquement significatives entre Hcy et SOD, d'une part, et entre Hcy et GPx, d'autre part, s'explique par le fait que l'homocystéine inhibe en partie l'activité antioxydante de la cellule [31].

Tous ces résultats permettent de conclure que la surproduction d'ERO dépasse la capacité antioxydante chez nos patients souffrant d'AI. Ce déséquilibre prolongé et permanent du stress oxydant est associé à l'évolution de la maladie vers un stade chronique.

Conclusion

Notre étude illustre clairement que dans les syndromes coronariens ischémiques, il y a une réduction significative du système antioxydant avec l'augmentation concomitante des paramètres du statut oxydant.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Nous tenons à remercier tous les personnels du laboratoire de biochimie et du service de cardiologie, CHU F. Hached de Sousse pour leurs coopération et aides très précieuses.

Références

- [1] Steg PG, Benamer H. Angor instable. Introduction. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2001;50:357–8.
- [2] Debierre V, Longo C, Potel G. Prise en charge du syndrome coronarien aigu à domicile. *Urgence Prat* 2005;70:37–9.
- [3] Duriez P. Mécanisme de formation de plaque d'athérome. *Rev Med Interne* 2004;25:3–6.
- [4] Göran K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95.
- [5] Dickson CB, Gotlib AL. Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:237–48.
- [6] Guillard J, Favier A, Potier G, Galan P, Hercberg S. L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur. *Pathol Biol* 2003;51:101–10.
- [7] Ana I, Mendonça I, Guerra G, Brion M, Reis Roberto P, Caracedo A, et al. Methylene tetrahydrofolate reductase gene homocysteine and coronary artery disease: the A 1298 polymorphism does matter influence from a case study. *Thromb Res* 2008;22:37–45.
- [8] Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, et al. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem* 2001;47(5):887–92.
- [9] Elahi MM, Matata BM. Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. *Arch Biochem Biophys* 2006;450(1):78–88.
- [10] Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP, Canaud B. Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie* 2002;23:201–8.
- [11] Defraigne J, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege* 2008;63:10–9.
- [12] Teiger E. Physiopathologie de l'angor instable. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2001;50:359–65.
- [13] Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 2006;39(8):794–803.
- [14] Wang H, Tan H, Yang F. Mechanisms in homocysteine-induced vascular disease. *ddmec* 2005;2(1):25–31.
- [15] Singh U, Jialal I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiol* 2006;13(3):129–42.
- [16] Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ* 2004;1:S56–64.
- [17] Nassef KM. The role of nitric oxide in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med* 2005;26(1–2):33–65.
- [18] Cheng J, Kaplowitz N. Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *WJG* 2004;10(12):1699–708.
- [19] Holvoet P, Collen D, Van de Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as a marker of acute coronary syndromes. *JAMA* 1999;281(18):1718–21.
- [20] Karatzis E, Lekakis J, Papamichael Ch, Andreadou I, Cimponeanu A, Aznaouridis K, et al. Rapid effect of pravastatin on endothelial function and lipid peroxidation in unstable angina. *Int J Cardiol* 2005;101:65–70.
- [21] Kotur-Stervuljevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clin Biochem* 2007;40:181–7.
- [22] Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas B, Drai J, Thérond P. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin* 2008;66(6):605–20.
- [23] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316–28.
- [24] Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. *ddst* 2008;5(1):5–12.
- [25] Pandey NR, Kaw G, Chandara M, Sanwal GG, Misra MK. Enzymatic oxidant and antioxidants of human blood platelets in unstable angina and myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2000;76(1):33–8.
- [26] Vijayasathya K, Shanthi NK, Sastry BK. Melatonin metabolite 6-Sulfatoxymelatonin, Cu/Zn superoxide dismutase, oxidized LDL and malondialdehyde in unstable angina. *Int J Cardiol* 2010;144(2):315–7.
- [27] Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *C R Biol* 2004;327:649–62.
- [28] Joanny Menvielle-Bourg F. Superoxide Dismutase (SOD), a powerful antioxidant, is now available orally. *Phytotherapie* 2005;3:1–4.
- [29] Motghare KS, Bhutay A, Murrhar BB, Madhur G, Meshram AW, Balasubramaniam Y. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase in ischemic disease. *Indian J Clin Biochem* 2001;16(2):213–5.
- [30] Roussel AM, Ferry M. Effect of myocardial infarction on erythrocytic glutathione peroxidase 1 activity and plasma vitamin E levels. *Am J Cardiol* 2009;103:471–5.
- [31] Rickenbacher P. Insuffisance cardiaque : épidémiologie, pathophysiologie. *Swiss Med F* 2001;4–9.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in follicular fluid and embryo culture medium and its impact on pregnancy prediction in IVF-ICSI treatment

Détermination de l'antigène HLA-G soluble dans le liquide folliculaire et dans le milieu de culture d'embryons comme indicateur du succès d'un traitement par FIV-ICSI

D.M. Wunder^a, M.H. Birkhäuser^b, N.A. Bersinger^{b,*}

^a Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital CHUV, Lausanne, Switzerland

^b Department of Obstetrics and Gynaecology, Inselspital, University of Berne, Effingerstrasse 102, 3010 Berne, Switzerland

Received 7 September 2012; accepted 23 October 2012

KEYWORDS

sHLA-G;
IVF-ICSI;
Outcome;
Follicular fluid;
Embryo culture
medium;
Pregnancy

MOTS CLÉS

sHLA-G ;
FIV-ICSI ;
Décours ;

Summary In IVF around 70% of embryos fail to implant. Often more than one embryo is transferred in order to enhance the chances of pregnancy, but this is at the price of an increased multiple pregnancy risk. In the aim to increase the success rate with a single embryo, research projects on prognostic factors of embryo viability have been initiated, but no marker has found a routine clinical application to date. Effects of soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) on both NK cell activity and on Th1/Th2 cytokine balance suggest a role in the embryo implantation process, but the relevance of sHLA-G measurements in embryo culture medium and in follicular fluid (FF) are inconsistent to date. In this study, we have investigated the potential of sHLA-G in predicting the achievement of a pregnancy after IVF-ICSI in a large number of patients ($n = 221$). sHLA-G was determined in media and in FF by ELISA. In both FF and embryo medium, no significant differences in sHLA-G concentrations were observed between the groups "pregnancy" and "implantation failure", or between the groups "ongoing" versus "miscarried pregnancies". Our results do not favour routine sHLA-G determinations in the FF nor in embryo conditioned media, with the current assay technology available.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé En cas de traitement par la fécondation in vitro (FIV), plus de 70% des embryons n'arrivent pas à s'implanter dans la matrice de l'utérus. Dans la plupart des cas, plus d'un embryon est donc transféré mais cela augmente le risque de grossesses multiples. Dans le but d'améliorer les chances de grossesse avec le transfert d'un seul embryon, des projets de recherche sur des facteurs prédictifs et sur la viabilité des embryons ont été poursuivis

* Corresponding author.

E-mail address: nick.bersinger@dkf.unibe.ch (N.A. Bersinger).

Liquide folliculaire ;
Milieu de culture ;
Grossesse

mais, à ce jour, aucun marqueur n'a pu être appliqué dans la pratique clinique. Les effets de la forme soluble de l'antigène HLA-G (sHLA-G) sur les cellules immunitaires NK et la balance des cytokines Th1/Th2 suggèrent un rôle du sHLA-G dans le processus d'implantation de l'embryon. Néanmoins, l'utilité des mesures du sHLA-G dans les milieux de culture d'embryons (MCE) et dans le liquide folliculaire (LF) reste sujette à des controverses. Dans cette étude, le potentiel du sHLA-G, déterminé par Elisa dans le LF et dans le MCE, pour la prédiction de grossesse a été investigué dans une cohorte de 221 patientes traitées par FIV-ICSI. Dans les deux sources (MCE et LF), il n'y avait aucune différence significative de la concentration de sHLA-G, ni entre les groupes des « grossesses (implantations) » et « échec d'implantation », ni entre ceux des grossesses portées à terme et des fausses-couches. Nous concluons qu'avec la technologie d'aujourd'hui, nos résultats ne sont pas en faveur de l'utilité d'une détermination de la mesure du sHLA-G dans les traitements FIV-ICSI en cours.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

The mechanism of human embryo implantation in the endometrium is still poorly understood in spite of very active research going on in this field. The large majority of embryos (> 70%) still fail to implant. In this context, in most cases of in vitro fertilization (IVF) and intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments, more than one embryo is transferred in order to enhance the chances of pregnancy. The major drawback of this handling is the high risk of multiple, mostly twin but especially triplet (and quadruplet) pregnancies. Multiple pregnancies are known to provoke an increased foetal and maternal morbidity as well as mortality. To avoid these severe complications, many research projects on prognostic factors of embryo viability have been developed [1,2].

Many studies have shown that embryo quality could be assessed by morphological criteria (cell number, cleavage stage, anucleate cell fragments, thickness of the zona pellucida, etc.). However, embryo quality is not strictly correlated with embryo viability and implantation potential [3–5]. Thus, other ways to better assess the prognosis of implantation of an individual embryo have to be explored in order to offer equal chances of pregnancy with the transfer of one single embryo presenting a high implantation potential. Several research projects have been going on, investigating the metabolism of the cultured embryos [6–8], the secretion of proteins into the culture media [9], gene expression in follicular granulosa cells [10] as well as the regulation of several molecules [11,12]. However, no metabolite has yet found routine clinical application for embryo selection to date.

In this study, we have investigated the potential of soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G) in predicting the achievement of a pregnancy after IVF-ICSI. HLA-G belongs to the non-classical class I major histocompatibility complex (MHC), located on chromosome 6. MHC genes seem to influence development and reproduction, but also the occurrence of repeated spontaneous miscarriages in humans [13]. The antigen exists in four membrane-bound (HLA-G1, G2, G3 and G4) and three soluble (HLA-G5, G6 and G7) isoforms. Effects of HLA-G on both Natural Killer (NK) cell activity [14] and on Th1/Th2 cytokine balance [15] have been shown,

suggesting a role in the embryo implantation process. As HLA-G is widely expressed in pregnancy, an important role in the maternal-foetal relationship has been attributed to this molecule. HLA-G is expressed in pre-implantation embryos, in chorionic foetal endothelium, in amniocytes as well as in the extravillous trophoblast of the placenta where it is the major representative of HLA [16–21]. Located on the trophoderm (the precursor of the placenta) of the embryo, HLA-G is a potentially interesting marker for embryo development, and its soluble form may thus be determined for the assessment of the chances for a successful implantation. An extensive review, in which the roles, functions and potential applications of this molecule are assessed, has recently been published [22].

HLA-G has been investigated in this context since 1996 [23]; it has also been detected in embryo culture medium [18,24]. Results concerning the relevance of sHLA-G measurements in culture medium are inconsistent to date. While several studies found a statistically significant difference between HLA-G-positive and HLA-G-negative embryo media for the achievement of a pregnancy [25,26] and even found embryo implantation occurring exclusively in sHLA-G-positive supernatants [27,28], others could not confirm these findings [29]. One study could not even detect HLA-G in any culture medium [30]. Concerning the relationship of sHLA-G production and embryo morphology, results in literature are controversial as well. While some authors could not find any correlation between embryo score and sHLA-G production [28], others showed that pregnancy success rates were superior and miscarriage rates lower when embryo selection was based on Embryo Score together with sHLA-G [31].

The reports in the literature are similarly controversial regarding the relevance or even the presence of sHLA-G in the follicular fluid (FF). One group [32] could not detect sHLA-G in the FF while others clearly demonstrated its presence in this compartment together with a positive outcome prediction [33,34].

The aim of the present study was to assess the relevance of the presence of sHLA-G in FF and in embryo conditioned culture medium for predicting the outcome of IVF-ICSI treatment towards pregnancy success, and to compare the validity of HLA-G with other prognostic parameters.

Materials and methods

Patients, IVF/ICSI treatment, and sample collection

In order to have a most uniform and homogenous study population, the study included 221 consecutive patients who underwent IVF treatment with ICSI for male factor in our department, had a long protocol stimulation regimen, and who had an embryo transfer on day 3 after oocyte pick-up (OPU). Inclusion criteria were a patient age of maximum 42 years and the absence of abnormal pre-treatment hormonal values, gynaecological ultrasound and cervical smear results, the absence of acute or chronic infectious diseases of the woman and/or her partner, of severe psychiatric illnesses, or being a carrier of severe genetic diseases and the availability of at least one embryo for embryo transfer and written informed consent. The present study was approved by the ethical committee of the University of Berne. The ovarian stimulation regimen was done by the long protocol and downregulation was started in the previous late luteal or in the early follicular phase, and achieved with Triptorelin 0.1 mg/day s.c. (Decapeptyl®, Ferring pharmaceuticals, Wallisellen, Switzerland). Stimulation was initiated after sonographic exclusion of ovarian cysts, absence of pregnancy and absence of follicular activity (estradiol (E_2) < 130 pmol/L) with recombinant Follicle Stimulating Hormone (rFSH; Gonol F®, Merck Serono, Geneva, Switzerland; Puregon®, Essex, Pfäffikon, Switzerland) or with urinary Human Menopausal Gonadotropin (HMG; Menopur®, Ferring pharmaceuticals, Wallisellen, Switzerland). Follicular maturation was assessed with ultrasound and estradiol measurements. When at least three follicles exceeded 17 mm of diameter and the estradiol concentration per mature follicle was at least 1000 pmol/L, ovulation was induced with human Chorionic Gonadotropin (hCG; Pregnyl®, Essex, Pfäffikon, Switzerland). Oocyte and FF recovery was performed 35 to 36 hours later by needle aspiration, with transvaginal ultrasound guidance and under routine intravenous sedation. FF from individual follicles was pooled and centrifuged for 10 min at 500g. The supernatants were stored at -30°C until analysed further. FF fractions with massive blood contamination were excluded.

ICSI was performed 3 to 6 hours after OPU and fertilization was assessed 17 hours after ICSI, in the pronuclear (PN) stage. According to the Swiss law of reproductive medicine, embryo selection and embryo cryopreservation are forbidden, making the single embryo transfer, as it is practiced in northern countries (Sweden, Belgium, etc.), impossible. One ($n = 41$), two ($n = 174$), or three ($n = 5$) of these fertilized cells with the highest score in the PN stage were selected for embryo culture and transfer; the remaining PN stage cells were cryopreserved according to the Swiss law. The selected PN cells were cultured at 37°C in fresh CO_2 equilibrated IVF medium (Vitrolife®, Göteborg, Sweden). A single, pooled microdroplet culture was set up for each patient in order to keep the volume of medium per embryo as low as possible. Embryo transfer was performed 3 days after ICSI in all cases. The Embryo Score was calculated by multiplying the number of blastomeres and the relative proportion of anucleate cell fragments (< 10% fragments, grade 4; 10–20% fragments, grade 3; 20–30% fragments, grade 2; > 30%

fragments, grade 1). The Cumulated Embryo Score (CES) was defined by adding up the individual scores of the transferred embryos for each patient. On the day of transfer, 10 μL of embryo conditioned medium were collected from the 20 μL microdroplet culture for technical reasons, in order to create a population of uniformly diluted samples, containing 50% of the protein. These samples were stored at -20°C , after dilution into 90 μL of blank cleavage medium to minimise the risk of evaporation, until testing for the presence of sHLA-G in batches. Care was taken to avoid any carryover of oil into the medium.

sHLA-G determination in follicular fluid and embryo culture medium

sHLA-G was quantified using the microplate ELISA method marketed by Bio Vendor—Exbio Praha, Brno, Czech Republic. The assay is based on a “sandwich” method, using a mouse monoclonal anti-sHLA-G antibody as a capture and a peroxidase labelled monoclonal anti-human $\beta 2$ -microglobulin as a detection antibody. The protocol provided by the manufacturer was followed, with the following slight modifications made in order to increase the sensitivity:

- the first antigen/antibody incubation was for 90 minutes at 30°C , with shaking at 300 rpm;
- the second antibody (conjugate) incubation was for 60 minutes at 30°C (with shaking);
- the incubation with the TMB substrate was for 30 minutes at room temperature, in the dark.

All FF and medium supernatant samples were introduced without further dilution (50 μL per well). The functional sensitivity of the assay was 1.0 U/mL. Intra- and inter-assay coefficients of variants at 10–12 U/mL were 5.0 and 12.3%, respectively. sHLA-G values were expressed as returned from the standard curve after cubic spline smoothing for follicular fluid, i.e. in concentration U/mL, and converted to the total amount in the sample (200 μL) for the embryo conditioned media, resulting in a detection limit of 0.2 U.

Measurement of steroid hormones, AMH, inhibin B and leptin in follicular fluid

The ovarian steroid hormones 17β -estradiol and progesterone were determined by radioimmunoassay, using the coated tube methodology Coat-a-count® assays from DPC, USA (Buhlmann Laboratories, Allschwil, Switzerland). Anti-Mullerian hormone (AMH) and inhibin B were determined as previously described for follicular fluid [35]. The microplate ELISA assay for leptin was developed in our laboratory for both serum and follicular fluid and performed as described [36].

Statistical analysis

Between the different outcome groups the pre-treatment parameters (age, BMI, basal FSH) and the results (total oocytes, mature oocytes, fertilized oocytes, number of embryos transferred, cumulative embryo score, sHLA-G,

AMH, leptin, inhibin B and steroid hormone levels) were compared by Student *t*-test or non-parametrically by Mann-Whitney U test, depending on their Gaussian distribution. Correlations of sHLA-G in serum and follicular fluid were assessed by Spearman rank correlation analysis. A *P*-value of 0.05 or less was considered as statistically significant.

Results

Clinical data

The mean age for the whole study population was 34.1 years (SD, 4.4). The pregnancy rate per transfer was 29% and the miscarriage rate 33%. In one case an ectopic pregnancy occurred; this was removed from the subsequent analysis. Of the ongoing pregnancies, 93% were singleton and 7% were twin; no triplet pregnancy occurred as a consequence of the low number of embryos transferred (Mean, $n = 1.8$). Table 1 shows the characteristics of the study population. The age of the women was significantly lower and the CES significantly higher in the group of patients with pregnancies compared with implantation failure.

Concentrations of soluble HLA-G, AMH, inhibin B, estradiol, progesterone and leptin in follicular fluid and medium

The results of the measurements in follicular fluid and culture medium are given in Table 2. No significantly different sHLA-G concentrations between the groups "pregnancy" (all pregnancies) and "implantation failure", or between the groups "ongoing" versus "miscarried pregnancies" were observed, and this was the case for both FF and embryo conditioned culture medium (Table 2). With the assay sensitivity of 1 U/mL sHLA-G was more frequently detected in the FF (182/200 = 83%) than in the conditioned media (166/220 = 75%). The median concentration over all samples was 15.0 U/mL (range < 5 to 113) in the follicular

fluid, and the median amount of the antigen in the embryo conditioned medium was 1.57 U (range < 0.2 to 38). Analyses to identify the question of a HLA-G production of a single embryo and the possible impact in comparing the different groups (1, 2, 3 embryos transferred) have been made; the comparison in the embryo culture medium between the different groups showed a clear trend (without reaching statistical significance) of a higher sHLA-G-production in the case of a higher number of embryos transferred. On the other hand, no difference in the sHLA-G level was observed in the follicular fluid as a function of the number of embryos transferred later.

Correlations

A significant correlation ($P = 0.0093$, Spearman Rank Correlation) was observed, over all patients, between the sHLA-G concentration in the FF and the one measured in the embryo conditioned culture medium (Fig. 1). In the follicular fluid, no correlations between the concentrations of sHLA-G and the examined steroid and protein hormones were found.

Discussion

The usefulness of the determination of HLA-G in FF and/or embryo conditioned culture medium as a non-invasive, sensitive and specific diagnostic marker for implantation capability is much debated. To the best of our knowledge, no study has shown that sHLA-G production was directly influenced by maternal age. However, the parameters maternal age, total/mature/fertilized oocytes and CES are known to be higher in the patients having a pregnancy later on. This was also the case in the population studied here.

It is important to consider the origin of the sHLA-G present in embryo conditioned media. As it is known that the human embryonic genome is not switched on before 2 days after fertilization [37], the embryo can theoretically produce its own HLA-G only from the four- to the eight-cell stage onwards. The results of our study confirm an sHLA-G

Table 1 Characteristics of the study population.

Parameter	A: ongoing pregnancy ($n = 42$)	B: miscarriage ($n = 21$)	C: implantation failure ($n = 157$)	<i>P</i> -value (A + B) vs. C	<i>P</i> -value A vs. B
Age (years)	32.8 ± 4.0	34.0 ± 5.2	34.5 ± 4.4*	0.0419*	0.2959
BMI (kg/m ²)	23.7 ± 3.3	22.2 ± 2.9	23.3 ± 4.1	0.8019	0.0874
Basal FSH (U/L)	8.25 ± 3.60	8.24 ± 2.86	8.27 ± 3.29	0.9733	0.9944
Total oocytes	9.8 ± 4.7	10.0 ± 5.3	7.6 ± 4.6	0.0013*	0.8566
Mature oocytes	7.4 ± 3.5	6.8 ± 3.0	5.5 ± 3.3	0.0007*	0.5228
Fertilized oocytes	5.5 ± 3.0	5.3 ± 2.8	4.2 ± 2.9	0.0048*	0.7362
Fertilization rate (%)	75.2 ± 17.5	75.9 ± 17.2	77.5 ± 20.7		
Number of embryos transferred	1.98 ± 0.35	1.90 ± 0.44	1.79 ± 0.44	0.0105*	0.4840
CES	49.8 ± 12.7	52.2 ± 11.6	40.0 ± 15.2	< 0.0001*	0.4741

Values are means ± SD. BMI: Body Mass Index; FSH: Follicle Stimulating Hormone; CES: Cumulated Embryo Score; *: statistically significant differences (Student *t*-test).

Table 2 Concentrations/absolute amounts of soluble HLA-G (follicular fluid and culture medium), AMH, inhibin B, estradiol, progesterone and leptin (follicular fluid).

Parameter	A: ongoing pregnancy (n = 42)	B: miscarriage (n = 22)	C: implantation failure (n = 157)	P-value (A + B) vs. C	P-value A vs. B
sHLA-G (units, CM)	0.80 (0.2–15.3)	3.00 (0.2–13.1)	1.65 (0.2–38.0)	0.3237	0.4095
sHLA-G (U/mL, FF)	18.3 (5.0–65.2)	17.2 (5.0–46.5)	14.1 (5.0–113)	0.0782	0.9477
AMH (ng/mL, FF)	3.29 (0.97–80.5)	4.22 (1.18–12.1)	2.53 (0.35–51.6)	0.0100*	0.8554
Inhibin B (ng/mL, FF)	40.0 (8.9–150)	56.3 (8.2–113)	36.7 (0.53–122)	0.0100*	0.1351
Estradiol (nmol/L, FF)	951 (350–2572)	973 (209–2213)	898 (128–3545)	0.1676	0.9709
Progesterone (μmol/L, FF)	29.7 (13.5–57.9)	30.5 (11.3–64.7)	32.8 (1.84–119)	0.1735	0.7429
Leptin (ng/mL, FF)	13.0 (3.2–79.1)	12.0 (3.5–47.7)	16.2 (2.0–68.9)	0.0364*	0.3287

Values are median and range. CM: culture medium; FF: follicular fluid; AMH: anti-Mullerian hormone; *: statistically significant differences (Mann-Whitney U test).

production by the embryo at this stage. Until now, it is not resolved whether the moment of HLA-G production initiation is more important for the success of implantation than is the amount of HLA-G produced, first exposed at the surface of the embryo and then released to be effective in a concentration-dependent fashion. Noci et al. [28] showed that the absence of sHLA-G in supernatants of IVF embryo medium has a 100% negative predictive value for clinical pregnancy. The positive predictive value, on the other hand, was very low (9.4%). Another study [29], however, showed pregnancies and live births in six out of 37 HLA-G-negative cycles, but the miscarriage rate in this study was much higher in the HLA-G negative group (25%) compared to the positive one (11%). They also found that the combination of sHLA-G presence and cleavage rate were most predictive of pregnancy. Their interpretation of this finding was that HLA-G, secreted by embryos, could enhance

embryo development and would be an explanation for why the cleavage rate is improved when embryos are cultured in groups [38,39]. Factors that can explain the different study results can be the standard of the different immunoassays, detection limit, reproducibility, as well as sensitivity and specificity.

Other factors can also influence the results, for example, the different techniques of embryo culture (type of medium, individual or pooled culture, day of sample collection) or the method of sample preservation to prevent degradation. It has to be stressed that one study showed big variations of sHLA-G concentrations in embryo supernatants comparing one infertility centre with another [40]. Possible explanations are differences in culture media, in conditions of assisted reproductive technologies and in technical procedures (IVF versus ICSI). Investigating ICSI cycles only, an association between the presence of HLA-G in embryo conditioned medium and the occurrence of a clinical pregnancy was observed in a recent study using an assay with increased sensitivity [41]. The controversial study results in the literature, however, question the utility of the marker, and our study results presented here similarly do not favour the application of this marker in daily practice.

Regarding sHLA-G in the FF, the information in the literature is contradictory as well. From a theoretical point of view, it would be conceivable to have better outcome results with embryos derived from oocytes recovered from sHLA-G positive FF since this compartment is an essential and specific microenvironment for the regulation of ovarian function, and the granulosa cells provide growth factors to the oocytes in order to sustain their development. In this context, HLA-G secretion by the granulosa cells play a role in the maturation process of the oocyte. Van Lierop et al. [32], however, found FF (and pre-implantation embryo culture supernatants) to be negative for sHLA-G, but a different assay method and different antibodies were used—possibly resulting in a lower sensitivity. His results are clearly in contrast with most of the other publications. Rizzo et al. [33] demonstrated the presence of sHLA-G in FF, HLA-G1 on polymorphonuclear cells and HLA-G5 in granulosa cells. Findings from another publication, however, showed no sHLA-G production from immature cumulus-oocyte complexes and a positive correlation of sHLA-G production with the quality

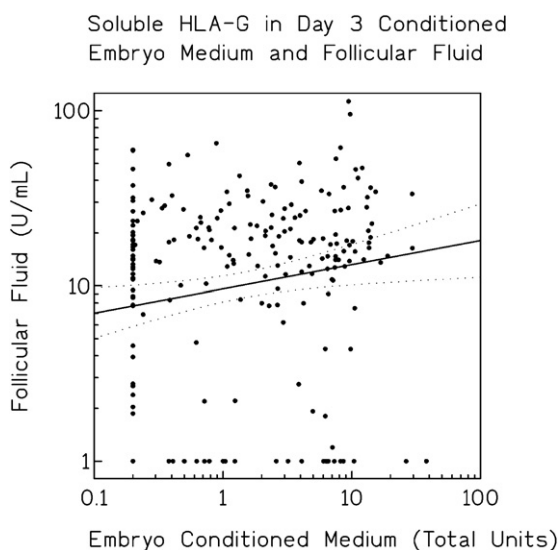


Figure 1 Correlation between the sHLA-G concentrations measure in the follicular fluid and in the embryo conditioned culture medium across all patients. The association is statistically significant ($P=0.0093$ by Spearman Rank Correlation Analysis).

of the cumulus-oocyte complexes [34]. Our study, with a large number of patients, did neither show any differences in HLA-concentrations in FF between the groups "pregnancy" versus "implantation failure", nor differences between the different groups with one, two or three embryos transferred.

The correlations of sHLA-G concentrations in FF and the corresponding embryo culture medium are under debate, too. One study [33] has found a significant correlation, others did not [42,43].

Moreover, two studies examining the secretion of HLA-G and pre-implantation genetic diagnosis (PGD) results found no significant difference in sHLA-G secretion between normal embryos and those diagnosed as chromosomally abnormal [43,44]. This would mean that the presence of measurable sHLA-G does not indicate chromosome normality, which is again in disfavour of performing routine sHLA-G determinations.

One meta-analysis concerning the accuracy of sHLA-G for predicting pregnancy has been performed [45] and the results are the following: the measurement of sHLA-G in the embryo culture supernatant should be performed only after the activation of the genome (from day 3 on), sHLA-G alone is not a valid selection criterion (selection should still be done by morphological criteria) and the diagnostic performance of sHLA-G is better in the presence of good quality embryos.

Interestingly, the study of Tabiasco et al. [40], from the only centre reporting a statistically significant association between sHLA-G positive embryo culture supernatants and implantation rates, included only ICSI cycles. Our study also included only ICSI cycles, but our results did not turn out to be the same.

HLA-G has also been detected in the serum of non-pregnant and pregnant women [46]. Interestingly, serum concentrations of sHLA-G did not differ between the two groups and it was postulated that peripheral blood mononuclear phagocytes and T and B cells would be the sources of sHLA-G in non-pregnant women. The finding of sHLA-G in the blood of non-pregnant women is intriguing because it could be hypothesised that circulating sHLA-G could influence human embryo implantation even before ovulation by enhancing endometrial receptivity. This is actually in agreement with one study: pre-ovulatory circulating serum HLA-G values were significantly lower in women with consecutive miscarriages compared to women with ongoing pregnancies [47]. Accordingly, the authors interpreted low HLA-G levels as a big risk factor for miscarriages because of a graft rejection in the case of low HLA-G serum concentrations. Unfortunately, this hypothesis has never been investigated further.

The strengths of our study include the large number of patients, the homogeneous study population (ICSI only, day 3 transfers only), and the stability in the reproductive medicine team (doctors and laboratory) during the study period. The drawback, however, lies in the retrospective study design.

In conclusion, in the light of the present controversies concerning the utility of sHLA-G in IVF-ICSI, our study mainly shows two important results: First, it confirms the production of sHLA-G by the embryo at the four- to the eight-cell stage. Second, and clinically more important, it does not speak in favour of a pronounced usefulness of sHLA-G

determinations, in FF or embryo conditioned medium, in current IVF-ICSI practice. But if the method to quantitate the antigen can be improved in the future, HLA-G in IVF medium will be likely to play a role in embryo selection [22]. One step in this direction is the introduction of luminex (xmap) technology which was shown to increase the sensitivity by a factor of 10 [41]. Then further studies, multicentre if possible, would be required in order to determine the usefulness of this marker in defined situations where the making of a decision for embryo selection would otherwise be difficult or impossible [48]. We therefore think that HLA-G determinations may well in the future find their place in ART practice together with morphological assessment, as long as the clinical situation is well defined and the technical possibilities improved in the laboratory.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgements

We would like to thank Susanne von Wyl and Anne Vaucher for technical assistance with the sample collection and with running the immunoanalytical procedures.

References

- [1] JOINT SOGC-CFAS. Guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization No.182, September 2006. *Int J Gynaecol Obstet* 2008;102:203–16.
- [2] Min JK, Hughes E, Young D, Gysler M, Hemmings R, Cheung AP, et al. Elective single embryo transfer following in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can* 2010;32:363–77.
- [3] Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001;75:514–8.
- [4] Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, et al. Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril* 1999;72:679–85.
- [5] Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997;12:1545–9.
- [6] Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001;76:1175–80.
- [7] Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Hum Reprod* 2007;22:3047–50.
- [8] Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 2008;23:1499–504.
- [9] Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86:678–85.

- [10] Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, et al. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;23:1118–27.
- [11] Hansis C, Edwards RG. Cell differentiation in the preimplantation human embryo. *Reprod Biomed Online* 2003;6: 215–20.
- [12] Roudebush WE, Wininger JD, Jones AE, Wright G, Toledo AA, Kort HI, et al. Embryonic platelet-activating factor: an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 2002;17:1306–10.
- [13] Ho HN, Gill TJ, Hsieh CY, Yang YS, Lee TY. The prevalence of recurrent spontaneous abortions, cancer, and congenital anomalies in the families of couples with recurrent spontaneous abortions or gestational trophoblastic tumors. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:461–6.
- [14] Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2-G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 2001;166:5018–26.
- [15] Kanai T, Fujii T, Unno N, Yamashita T, Hyodo H, Mik A, et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2001;45:94–9.
- [16] Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, et al. Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 1997;27:3380–8.
- [17] Hammer A, Hutter H, Dohr G. HLA class I expression on the materno-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:150–7.
- [18] Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:161–5.
- [19] Loke YW, King A, Burrows TD. Decidua in human implantation. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl. 2):14–21.
- [20] McMaster M, Zhou Y, Shorter S, Kapasi K, Geraghty D, Lim KH, et al. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. *J Immunol* 1998;160:5922–8.
- [21] Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL. Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses. *J Immunol* 2005;175:8379–85.
- [22] Dahl M, Hviid TV. Human leukocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2012;18:92–109.
- [23] Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Librach CL. Embryonic human leukocyte antigen-G expression: possible implications for human preimplantation development. *Fertil Steril* 1996;65:997–1002.
- [24] Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Scarselli G, Baricordi O, et al. Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium. *Hum Immunol* 1999;60:1054–7.
- [25] Sher G, Keskinetepe L, Nouriani M, Roussev R, Batzofin J. Expression of sHLA-G in supernatants of individually cultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome. *Reprod Biomed Online* 2004;9:74–8.
- [26] Sher G, Keskinetepe L, Fisch JD, Acacio BA, Ahlering P, Batzofin J, et al. Soluble human leukocyte antigen G expression in phase I culture media at 46 hours after fertilization predicts pregnancy and implantation from day 3 embryo transfer. *Fertil Steril* 2005;83:1410–3.
- [27] Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002;32:311–5.
- [28] Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138–46.
- [29] Yie SM, Balakier H, Motamedi G, Librach CL. Secretion of human leukocyte antigen-G by human embryos is associated with a higher in vitro fertilization pregnancy rate. *Fertil Steril* 2005;83:30–6.
- [30] Sageshima N, Shobu T, Awai K, Hashimoto H, Yamashita M, Takeda N, et al. Soluble HLA-G is absent from human embryo cultures: a reassessment of sHLA-G detection methods. *J Reprod Immunol* 2007;75:11–22.
- [31] Kotze DJ, Hansen P, Keskinetepe L, Snowden E, Sher G, Kruger T. Embryo selection criteria based on morphology versus the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:309–16.
- [32] Van Lierop MJ, Wijnands F, Loke YW, Emmer PM, Lukassen HG, Braat DD, et al. Detection of HLA-G by a specific sandwich ELISA using monoclonal antibodies G233 and 56B. *Mol Hum Reprod* 2002;8:776–84.
- [33] Rizzo R, Fuzzi B, Stignani M, Criscuoli L, Melchiorri L, Dabizzi S, et al. Soluble HLA-G molecules in follicular fluid: a tool for oocyte selection in IVF? *J Reprod Immunol* 2007;74:133–42.
- [34] Rizzo R, Dal Canto MB, Stignani M, Fadini R, Fumagalli D, Renzini MM, et al. Production of sHLA-G molecules by in vitro matured cumulus-oocyte complex. *Int J Mol Med* 2009;24:523–30.
- [35] Wunder DM, Guibourdenche J, Birkhäuser MH, Bersinger NA. Anti-Müllerian hormone and inhibin B as predictors of pregnancy after treatment by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2008;90:2203–10.
- [36] Wunder DM, Kretschmer R, Bersinger NA. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. *Hum Reprod* 2005;20:1266–71.
- [37] Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332:459–61.
- [38] Moessner J, Dodson WC. The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil Steril* 1995;64:1034–5.
- [39] Almagor M, Bejar C, Kafka I, Yaffe H. Pregnancy rates after communal growth of preimplantation human embryos in vitro. *Fertil Steril* 1996;66:394–7.
- [40] Tabiasco J, Perrier-d'Hauterive S, Thonon F, Parinaud J, Léandri R, Foidart JM, et al. Soluble HLA-G in IVF/ICSI embryo culture supernatants does not always predict implantation success: a multicentre study. *Reprod Biomed Online* 2009;18:374–81.
- [41] Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H. Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos. *Hum Immunol* 2007;68:251–8.
- [42] Lédée N, Thonon F, Perrier-d'Hauterive S, Foidart JM, Heck N, Munault C. Significance of soluble HLA-G detection in follicular fluids and embryo supernatants in IVF/ICSI cycles. *Am J Reprod Immunol* 2007;57:5–7.
- [43] Shaikly VR, Morrison IE, Taranissi M, Noble CV, Withey AD, Cherry RJ, et al. Analysis of HLA-G in maternal plasma, follicular fluid, and preimplantation embryos reveal an asymmetric pattern of expression. *J Immunol* 2008;180:4330–7.
- [44] Desai N, Filipovits J, Goldfarb J. Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit. *Reprod Biomed Online* 2006;13:272–7.
- [45] Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P. Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2008;14:209–18.
- [46] Puppo F, Costa M, Contini P, Brenci S, Cevasco E, Ghio M, et al. Determination of soluble HLA-G and HLA-A-B, and -C molecules in pregnancy. *Transplant Proc* 1999;31:1841–3.

- [47] Pfeiffer KA, Rebmann V, Pässler M, van der Ven K, van der Ven H, Krebs D, et al. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol* 2000;61: 559–64.
- [48] Rebmann V, Switala M, Eue I, Grosse-Wilde H. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod* 2010;25:1691–8.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Oxidative stress markers in schizophrenic patients

Les marqueurs du stress oxydant chez les patients schizophréniques

H. Mabrouk^{a,*,b}, I. Houas^a, H. Mechria^c, A. Mechri^{b,c}, W. Douki^{a,b},
L. Gaha^{b,c}, M.F. Najjar^a

^a Biochemistry-Toxicology Laboratory, University Hospital of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

^b Research Laboratory "Vulnerability to psychotic disorders LR 05 ES 10", Psychiatry Department, University Hospital of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

^c Psychiatry Department, University Hospital of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

Received 29 June 2012; accepted 17 October 2012

KEYWORDS

Schizophrenia;
TBARS;
Non-enzymatic
antioxidants;
Oxidative stress

Summary

Objective. – This study aimed to investigate the variations of the plasma TBARS levels (lipid peroxidation marker) and of the non-enzymatic antioxidants (uric acid, bilirubin and albumin) and their associations with the clinical and therapeutic characteristics in schizophrenic patients. **Patients and methods.** – A case control study included 121 schizophrenic patients and 88 control subjects aged respectively, 37.3 ± 10.3 and 33.5 ± 13.9 years. TBARS was determined by spectrophotometric method based on the reaction between malonedialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA). Plasma uric acid (UA) and total bilirubin (TB) concentrations were determined using Cobas 6000TM and albumin level was determined using Konelab 30TM equipment.

Results. – Compared to controls, patients had significantly higher levels of UA (270 ± 68 vs. 220 ± 73 ; $P < 0.0001$) and lower levels of TB (4.74 ± 3.58 vs. 14.67 ± 8.01 ; $P < 0.0001$). Furthermore, TBARS levels were significantly correlated with albumin. The highest TBARS levels were noted in paranoid sub-type and in patients treated with typical antipsychotics, but without significant differences. Moreover, the risk doubled for an increase in UA was significantly more frequent in schizophrenic patients.

Conclusion. – Schizophrenic patients had an increase in TBARS levels and perturbations in their non-enzymatic antioxidant status that contribute to increase the risk of oxidative stress. In addition, our results revealed that there was no association between the increase of TBARS levels, non-enzymatic antioxidants and any clinical or therapeutic characteristics. Therefore, such patients require specific care, particularly with regard to their lipid peroxidation and their non-enzymatic antioxidant.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: hajer_mabrouk@yahoo.fr (H. Mabrouk).

MOTS CLÉS

Schizophrénie ;
TBARS ;
Antioxydants non
enzymatiques ;
Stress oxydant

Résumé

Objectif. — Étudier les variations du taux plasmatique de TBARS (marqueur de la peroxydation lipidique) et des antioxydants non enzymatiques (acide urique, bilirubine et albumine) et leurs associations avec les caractéristiques cliniques et thérapeutiques chez des patients schizophrènes.

Patients et méthodes. — Notre étude a concerné 121 patients schizophrènes et 88 sujets témoins, âgés respectivement de $37,3 \pm 10,3$ et $33,5 \pm 13,9$ ans. Le dosage du malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation lipidique, a été déterminé par une méthode spectrophotométrique basée sur sa réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Les concentrations plasmatiques de l'acide urique (AU) et de la bilirubine totale (BT) ont été déterminées sur Cobas 6000™ (Roche Diagnostics). Le dosage de l'albumine a été effectué sur Konélab 30™ (Thermo Electron Corporation).

Résultats. — Les concentrations plasmatiques de l'acide urique étaient significativement plus élevées (270 ± 68 vs 220 ± 73 ; $p < 0,0001$) et celles de la bilirubine plus basses ($4,74 \pm 3,58$ vs $14,67 \pm 8,01$; $p < 0,0001$) chez les patients schizophrènes par rapport aux témoins. Cependant, les TBARS sont significativement corrélés avec l'albumine. Les concentrations plasmatiques de TBARS étaient plus élevées dans le sous-type paranoïde et chez les patients traités par les antipsychotiques typiques, mais sans différence significative. L'augmentation de l'AU était significativement plus fréquente chez les patients schizophrènes avec un risque multiplié par deux.

Conclusion. — Les patients schizophrènes présentent une augmentation des concentrations plasmatiques de TBARS, de l'acide urique et de la bilirubine, qui pourrait être en relation avec la physiopathologie de la schizophrénie. Le suivi clinique et biologique de ces patients et le contrôle régulier de leur statut antioxydant sont à recommander dans le cadre de leur prise en charge globale.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Schizophrenia is a neuropsychiatric disorder that affects approximately 1% of the population [1–3]. One of the factors contributing to the development of schizophrenia is thought to be oxidative damage to neuronal cells [1].

Oxidative stress is the condition that occurs from the imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems. Also, brain is particularly vulnerable to oxidative stress as a result of the relatively low levels of antioxidants, high levels of polyunsaturated fatty acids and increased need of oxygen [2–4].

There are strong links between oxidative stress anomalies and the pathophysiology of schizophrenia, indicated by the increased lipid peroxidation products in plasma and red cells, altered levels of both enzymatic and non-enzymatic antioxidants in chronic schizophrenic patients [6,7].

The aim of this study was to investigate the variations of the plasma TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) levels as a lipid peroxidation marker, and of three non-enzymatic antioxidants (uric acid, bilirubin and albumin) and their association with clinical and therapeutic characteristics in patients with schizophrenia.

Materials and methods**Subjects**

Our case control study included 121 patients with schizophrenia from the psychiatric department of the University Hospital Fattouma Bourguiba of Monastir. The mean age was 37.3 ± 10.3 years. There were 21 women

(38.2 ± 10.2 years) and 100 men (37.1 ± 10.4 years). Consensus on the diagnosis, according to the Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV) criteria [8], was made by psychiatrists. Patients who had other psychiatric illness, epilepsy or mental retardation, suffering from endocrinological or cardiovascular diseases were excluded from the study. The control group consisted of 88 volunteer subjects without psychiatric or endocrinological diagnoses. The mean age was $33.5 \pm 13,9$ years, with 31 women (44.5 ± 12.2 years) and 57 men (27.6 ± 10.7 years). All participants were interviewed about their age, personal medical history, previous treatments, cigarette and alcohol consumption habits. This study was approved by the local ethical committee and informed consent was obtained from each participant before procedure, all subjects were from Tunisian origin. Demographic, clinical and therapeutic characteristics of the population are shown in Table 1. There were significant differences in the mean age, gender and BMI between the two groups (Table 1).

Samples

After 12 hours of an overnight fast, venous blood for each patient was drawn into lithium-heparin tubes, and immediately centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The plasma samples were stored at -20°C until the biochemical analysis.

Biochemical analysis

Plasma uric acid (UA) and total bilirubin (TB) concentrations were determined by enzymatic methods using Cobas 6000™

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the sample population.

	Schizophrenic patients(n = 121)	Control group(n = 88)	P value
Sex ratio (male/female)	(4.76) 100/21	(1.83) 57/31	0.005
Age (years \pm SD)	37.3 \pm 10.3	33.5 \pm 13.9	0.027
BMI (kg/m ²)	25.2 \pm 3.7	25.5 \pm 3.8	0.190
Duration of illness (years \pm SD)	9.1 \pm 7.3	—	—
Cigarette smoking			
Smokers	76 (62.8)	52 (59.1)	0.688
Non-smokers	45 (37.2)	36 (40.9)	
Alcohol beverage			
Consumers	25 (20.7)	16 (18.2)	0.687
Non-consumers	96 (79.3)	72 (81.8)	
Clinical sub-type			
Disorganized	26 (21.5)	—	—
Undifferentiated	58 (47.9)	—	—
Paranoid	37 (30.6)	—	—
Antipsychotics			
Typical	103 (85.1)	—	—
Atypical	6 (4.9)	—	—
Typical + Atypical	12 (10)	—	—

Bold data represent significant results.

(Roche Diagnostics) and albumin level was determined by colorimetric technique using Konelab 30™ equipment (Thermo Electron Corporation).

Lipid peroxidation (TBARS) assay

Lipid peroxidation was determined by spectrophotometric method based on the reaction between malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid (TBA) [9]. Briefly, 150 μ L of each plasma were mixed with 500 μ L of 20% trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, Germany) and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Then, 250 μ L of 0.8% TBA (Sigma, Germany) were added to 500 μ L of the supernatant. The mixture was heated in boiling water for 30 min. After cooling on ice, the resulting chromogen was extracted with 650 μ L of *n*-butyl alcohol. The organic phase was separated by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and absorbance was recorded at wavelength of 532 nm. MDA solution was made freshly by the hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) (Sigma, Germany) used as standard. The results are expressed as nmol MDA/mL plasma.

Clinical evaluations

Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height meter squared (m²). Obesity was defined when BMI \geq 30 kg/m² [10].

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). Quantitative variables were presented as mean \pm SD and qualitative variables comparisons were performed using χ^2 test. Comparisons between patients and controls were performed using analysis of variance (ANOVA)

after adjustment for potential confounder factors (gender, age, BMI). Correlations were determined using Pearson test. The calculation of the disruption risk of oxidative stress parameters was done using the quartile. The statistical significance level was set at $P < 0.05$.

Results

The schizophrenic patients had significantly higher levels of UA and lower levels of TB compared to the control group (UA = 270 \pm 68 vs. 220 \pm 73, $P < 0.0001$; TB = 4.74 \pm 3.58 vs. 14.67 \pm 8.01, $P < 0.0001$). There was no significant difference between the groups on levels of albumin and TBARS (albumin = 55.2 \pm 19.8 vs. 52.1 \pm 8.4, $P = 0.176$; TBARS = 7.46 \pm 4.68 vs. 6.87 \pm 2.50, $P = 0.293$) (Table 2).

After adjustment of oxidative stress markers for confounder factors, we noted a significant difference between patients and controls for AU values ($P < 0.0001$) and BT ($P < 0.0001$), but no significant variation was observed for albumin ($P = 0.069$) and TBARS ($P = 0.152$) (Table 2).

In patients, there was no significant difference according to the sub-type of schizophrenia in oxidative stress markers. However, disorganized patients had higher mean values of UA and albumin. Moreover, we found higher mean values of TBARS levels in paranoid patients than other patients (Table 3).

We also showed that these oxidative stress markers were not significantly associated with the antipsychotic treatment, since, patients treated with a typical antipsychotic treatment had the highest levels in the TBARS and the lowest levels in TB. Moreover, patients treated with combination of typical and atypical antipsychotics had the highest levels of albumin and the lowest levels of TBARS (Table 3).

Disturbances parameters of oxidative stress were significantly more frequent in schizophrenic patients than

Table 2 Comparisons of oxidative stress markers between schizophrenic patients and controls.

Biological variables	Patients (n = 121)	Controls (n = 88)	P value	P value ^a
Uric acid (μmol/L)	270 ± 68	220 ± 73	< 0.0001	< 0.0001
Bilirubin (μmol/L)	4.74 ± 3.58	14.67 ± 8.01	< 0.0001	< 0.0001
Albumin (g/L)	55.2 ± 19.8	52.2 ± 8.5	0.176	0.069
TBARS (nmol/mL)	7.46 ± 4.68	6.87 ± 2.50	0.293	0.152

Bold data represent significant results.

^a ANOVA test adjusted by gender, age and BMI.

Table 3 Variations of oxidative stress markers in schizophrenic patients according to clinical sub-types and treatments.

Variables	Uric acid (μmol/L)	Bilirubin (μmol/L)	Albumin (g/L)	TBARS (nmol/mL)
Clinical sub-types				
Undifferentiated (n = 58)	273 ± 70	5.06 ± 7.72	53.72 ± 22.82	7.03 ± 4.61
Paranoid (n = 37)	256 ± 67	4.41 ± 3.72	53.84 ± 13.72	8.12 ± 4.87
Disorganized (n = 26)	283 ± 65	4.51 ± 3.11	60.51 ± 19.82	7.48 ± 4.62
P	0.267	0.646	0.309	0.545
Antipsychotics				
Typical (n = 103)	269 ± 67	4.62 ± 3.65	54.91 ± 19.43	7.76 ± 4.80
Atypical (n = 6)	266 ± 89	5.58 ± 3.24	52.56 ± 20.84	6.42 ± 4.78
Typical + Atypical (n = 12)	268 ± 72	5.44 ± 3.26	59.53 ± 24.13	5.21 ± 2.61
P	0.849	0.655	0.724	0.195

Table 4 Disturbances parameters of oxidative stress parameters.

Parameters	Patients		Controls		OR	CI 95%	P
	n	%	n	%			
UA (μmol/L)							
< 226	31	50.8	45	88.2	7.258	[2.700 – 19.508]	< 0.0001
> 315	30	49.2	6	11.8	2.418 ^b	[1.389 – 4.209] ^b	0.002^a
TB (μmol/L)							
< 2.3	30	50	0	—	—	—	—
> 6.25	30	50	83	100	—	—	—
Albumin (g/L)							
< 45.2	31	50.8	22	62.8	1.638	[0.700 – 3.831]	0.254
> 60.2	30	49.2	13	37.2	1.342 ^b	[0.855 – 2.107] ^b	0.201 ^a
TBARS (nmol/mL)							
< 3.41	30	50	12	100	—	30	50
> 10.63	30	50	0	0	—	—	—

OR: odds ratio; CI: confident interval 95%; UA: uric acid; TB: total bilirubin.

Bold data represent significant results.

^a ANOVA test adjusted by gender, age and BMI.

^b Calculation of the disruption risk of oxidative stress parameters was done using the quartile.

controls, with the risk doubled for an increase in UA (Table 4).

Only albumin was significantly correlated with TBARS levels ($r = 0.211$; $P = 0.020$) (Table 5).

Discussion

Schizophrenic patients had higher plasma TBARS levels than control subjects, without significant difference. Ranjekar

Table 5 Relationship between TBARS and non-enzymatic antioxidants in schizophrenic patients.

Biological variables	r	P
Uric acid	0.110	0.230
Total bilirubin	0.039	0.673
Albumin	0.211	0.020

Bold data represent significant results.

et al. [11] did not find an increase in plasma lipid peroxides TBARS in schizophrenic patients, although some other studies have reported an increase of lipid peroxides in schizophrenic patients [1,4,12–14]. Increased MDA levels might be the result of increased free radical production and/or inadequate response of antioxidative defense mechanisms. Since brain tissue is accepted to be vulnerable to free radical damage, it was speculated that the oxidative stress observed in the periphery is even more serious in the brain [5]. Indeed, Gama et al. [7] reported that a high level of TBARS is a sign of peroxidative injury to membrane phospholipids. Neuronal functioning is affected by this injury either by changes in membrane fluidity or by alterations in membrane receptors, which can cause altered neurotransmitter uptake and release, and even cell death. Padurariu et al. [4] have shown increase levels of TBARS in plasma, erythrocytes, leucocytes, and platelets in schizophrenic patients. The elevation of plasma lipid peroxides, an indicator of lipid peroxidation and one of the key indices of membrane pathology, support the hypothesis that a contribution of oxidative stress-mediated cellular membrane pathology may be involved in the pathophysiology of schizophrenia [12,13,16,17].

Among the non-enzymatic antioxidant, we find a significantly higher level of UA and lower level of TB in the schizophrenic patients compared to the control group. Plasma UA level was studied for its strong antioxidant characteristic and it has been suggested that decreased UA provides an additional support to the hypothesis that antioxidant stress in schizophrenia may be due to a defect in the antioxidant system [18]. Several studies [2,16,19,20] had shown lower plasma antioxidants (albumin, bilirubin and uric acid) in schizophrenic patients than controls. Hence, these findings suggest that oxidative stress occurs in the early course of schizophrenia, and may have an important role in pathogenesis and symptomatology of schizophrenia. There is increasing evidence that schizophrenia is associated with abnormalities in the antioxidant defense system and redox signaling [16,19]. Moreover, Akyol et al. [18] have shown a relationship between hyperbilirubinemia and Gilbert's syndrome in schizophrenia. Hyperbilirubinemia among patients with schizophrenia has been variously explained by an increase in vulnerability of red blood cells membranes, effect of medication or due to stress [18,21].

On the other hand, oxidative stress markers were not associated to the sub-type of schizophrenia. However, disorganized patients had higher mean values of UA and albumin. Moreover, paranoid patients had higher mean values of TBARS than others. These results suggest that there is a difference in oxidative stress in different sub-types of schizophrenia. Zhang et al. [12] reported that paranoid, disorganized and residual schizophrenic patients had higher MDA levels than healthy controls, but there were no significant differences in MDA levels among the schizophrenic subgroups. Akyol et al. [18] studied the TBARS levels in a sample of disorganized, paranoid and residual schizophrenics; only the TBARS level of the residual schizophrenics was significantly higher than the healthy controls. Gama et al. [7] found no difference among different sub-types (paranoid, disorganized and undifferentiated) for the mean serum TBARS concentrations.

The exact effect induced by different typical or atypical medications on both antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels is still not known [12]. A further finding of our study is that there were no significant differences among the typical and atypical antipsychotic treatments of schizophrenic patients in any parameter tested in this study. This result suggests that long-term treatment with both typical and atypical antipsychotics may produce the similar effects on the activities of the non-enzymatic antioxidants and the levels of lipid peroxidation. Kunz et al. [13] showed a decrease on oxidative stress parameters associated with chronic antipsychotics treatment. The mechanism through which antipsychotics decrease oxidative stress might involve modulation of the molecular regulation of expression of antioxidant enzymes. Antipsychotic drugs have been found to induce the expression of immediate early genes such as c-fos and c-jun transcription factors, growth factors and peptides [17]. These early genes and growth factors can subsequently regulate the expression of antioxidant enzymes, which provide a part of neuroprotective mechanisms associated with growth factors [17]. Ng et al. [22] reported that a differential impact on oxidative stress status may exist between typical and atypical antipsychotic medications. Indeed, higher levels of lipid peroxidation products have been reported in patients treated with typical rather than atypical drugs. However, some studies have reported an increased lipid peroxidation only in rats chronically treated with haloperidol, but not in animals treated with atypical antipsychotics [4,7,15,23]. Reddy et al. [16] reported that plasma antioxidants (albumin, bilirubin and uric acid) were significantly reduced in schizophrenic patients. More importantly, these reductions are observed independently of treatment since patients were neuroleptic-naïve. Yao et al. [24] reported that individual antioxidants (albumin, bilirubin and uric acid) were significantly reduced in plasma of chronic schizophrenic patients, during on and off haloperidol treatment conditions. However, these findings are inconsistent with typical and atypical antipsychotics, which suggests that typical and atypical antipsychotics may not have a direct regulatory effect on oxidative stress in patients with schizophrenia [12].

However, in contrast with other studies [25,26], no correlation was found between plasma TBARS and plasma non-enzymatic antioxidant concentrations in the present study. It should be noted that the antioxidant defense system is a very complex system including non-enzymatic components (albumin, bilirubin, uric acid, etc.). Additional studies are needed to confirm this hypothesis.

Several limitations should be noted in our study. First, a larger sample size of groups would be beneficial. Second, our work is a cross-sectional study that does not permit follow-up of biological parameters. Third, the sample of schizophrenic patients may not be representative of more heterogeneous population. Finally, although the classical determination of MDA by complexation with TBA is widely used for assaying lipid peroxides, clinical application is limited because it tends to be highly susceptible to experimental conditions. One alternative approach is to separate interfering substances from MDA-TBA adduct by high-pressure liquid chromatography (HPLC) prior to spectrophotometric measurement. This HPLC procedure provides considerably better sensitivity and specificity, which results in more

reliable reference values than any previously published results.

Conclusion

Schizophrenic patients had an increase in TBARS levels and perturbations in their non-enzymatic antioxidant status that contribute to increase the risk of oxidative stress. In addition, our results revealed that there was no association between the increase of TBARS levels, non-enzymatic antioxidant and any clinical or therapeutic characteristics. Therefore, such patients require specific care, particularly with regard to their lipid peroxidation and their non-enzymatic antioxidant.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

References

- [1] Gravina P, Spoletini I, Masini S, Valentini A, Vanni D, Paladini E, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTA1 as risk factors for schizophrenia. *Psychiatr Res* 2011;187:454–6.
- [2] Bitanirwe BK, Woo TUW. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:878–93.
- [3] Singh OP, Chakraborty I, Dasgupta AA, Datta S. A comparative study of oxidative stress and interrelationship of important antioxidants in haloperidol and olanzapine treated patients suffering from schizophrenia. *Indian J Psychiatry* 2008;50:171–6.
- [4] Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett* 2010;479:317–20.
- [5] Sarandol A, Kirli S, Akkaya C, Altin A, Demirci M, Sarandol E. Oxidative-antioxidative systems and their relation with serum S100 B levels in patients with schizophrenia: effects of short term antipsychotic treatment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1164–9.
- [6] Mahmood IH, Abdullah KS, Khatib I. Antioxidant status in schizophrenic patients. *Bahrain Med Bull* 2007;29(3) [Available from URL: http://www.bahrainmedicalbulletin.com/September_2007/antioxidant.pdf].
- [7] Gama CS, Salvador M, Andreazza AC, Lobato MI, Berk M, Kapczinski F, et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. *Neurosci Lett* 2008;433:270–3.
- [8] American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. Washington DC, USA: American Psychiatric Association; 2004.
- [9] Pirinccioglu AG, Gökalp D, Pirinccioglu M, Kizilc G, Kizilc M. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2010;43:1220–4.
- [10] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic (publication WHO/NUT/NCD/98.1). Geneva, Switzerland: The World Health Organization; 1997.
- [11] Ranjekar PK, Hinge A, Hegde MV, Ghatge M, Kale A, Sitasawad S, et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatr Res* 2003;121:109–22.
- [12] Zhang XY, Tan YL, Cao LY, Wu GY, Xu Q, Shen Y, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different forms of schizophrenia treated with typical and atypical antipsychotics. *Schizophr Res* 2006;81:291–300.
- [13] Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1677–81.
- [14] Ben Othmen L, Mechri A, Fendri C, Bost M, Chazot G, Gaha L, et al. Altered antioxidant defense system in clinically stable patients with schizophrenia and their unaffected siblings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:155–9.
- [15] Young J, McKinney SB, Ross BM, Wahle KWJ, Boyle SP. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2007;76:73–85.
- [16] Reddy R, Keshavan M, Yao JK. Reduced plasma antioxidants in first-episode patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 2003;62:205–12.
- [17] Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001;25:463–93.
- [18] Akyol Ö, Herken H, Uz E, Fadilloğlu E, Ünal S, Söğüt S, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:995–1005.
- [19] Li XF, Zheng YL, Xiu MH, Chen DC, Kosten TR, Zhang XY. Reduced plasma total antioxidant status in first-episode drug-naïve patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:1064–7.
- [20] Wood SJ, Yücel M, Pantelis C, Berk M. Neurobiology of schizophrenia spectrum disorders: the role of oxidative stress. *Ann Acad Med Singapore* 2009;38:396–401.
- [21] Radhakrishnan R, Kanigere M, Menon J, Calvin S, Janish A, Srinivasan K. Association between unconjugated bilirubin and schizophrenia. *Psychiatry Res* 2011;189:480–2.
- [22] Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:851–76.
- [23] Muszalska AD, Kontek B, Jabłońska. Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation in vitro. *Neuropsychobiology* 2011;63:197–201.
- [24] Yao JK, Reddy R, Van Kammen DP. Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia. *Psychiatr Res* 2000;97:137–51.
- [25] Zhang XY, Tan YL, Zhou DF, Cao LY, Wu GY, Haile CN, et al. Disrupted antioxidant enzyme activity and elevated lipid peroxidation products in schizophrenic patients with tardive dyskinesia. *J Clin Psychiatry* 2007;68:754–60.
- [26] Evan DR, Parikh VV, Khan M, Coussons C, Buckley PF, Mahadik SP. Red blood cell membrane essential fatty acid metabolism in early psychotic patients following antipsychotic drug treatment. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:393–9.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



TECHNIQUES AU QUOTIDIEN

À propos du dosage de la transferrine désialylée (CDT) et de ses indications

About the determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its indications

A. Szymanowicz

113, rue du Dr-Schweitzer, 42153 Riorges, France

Reçu le 26 avril 2012 ; accepté le 22 octobre 2012

KEYWORDS

Desialylated transferrin;
Transferrin carbohydrate-deficient;
CDT;
Alcoholism;
Abstinence;
Driving

MOTS CLÉS

Transferrine désialylée ;
Transferrine carbohydrate déficiente ;
CDT ;
Alcoolisme ;
Abstinence ;
Conduite automobile

Summary This article reviews the main molecular and pathophysiological characteristics of desialylated transferrins. Assay methods and their limitations are discussed. Finally, the indications and interpretation of results of this test are put into perspective.
© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé L'article rappelle les principales caractéristiques moléculaires et physiopathologiques des transferrines désialylées. Les méthodes de dosage de la CDT ainsi que leurs limites sont exposées. Enfin les indications de cet examen et l'interprétation des résultats sont mis en perspective.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La transferrine désialylée est un marqueur spécifique et sensible de l'abus chronique de boissons alcooliques. Son dosage a connu de nombreuses améliorations lui conférant,

Adresse e-mail : antonszymanowicz-chr@sfr.fr

ces dernières années, les qualités d'un examen biologique cliniquement performant. Cependant, il n'en demeure pas moins que cet examen spécialisé doit être interprété avec toutes les précautions requises pour un marqueur dont la définition elle-même a évolué et dont le taux sérique est faible. Nous proposons dans cet article de faire un point sur l'évolution des méthodes de dosage, leurs standardisations et les précautions pour l'interprétation des résultats. Cet examen est encore relativement peu prescrit en France et donc réalisé par un faible nombre de laboratoires plus spécialisés ou ayant un fort recrutement local et régional. En revanche, pratiquement tous les biologistes peuvent être amenés à répondre à des questions émanant de médecins ou de patients pour en expliquer l'intérêt ou en interpréter les résultats. Cet article peut les aider dans ces situations.

Structure et caractéristiques moléculaires

La transferrine désialylée possède un grand nombre de synonymes : asialotransferrine, transferrine hyposialylée, *carbohydrate deficient transferrin* (CDT), transferrine déficiente en acide sialique. Le plus communément utilisé est la dénomination CDT. Stibler a montré que les glycoformes désialylées (disialotransferrine [DST] et asialotransferrine [AST]) de la transferrine étaient anormalement élevées chez les patients alcooliques chroniques [1]. Initialement, la somme AST, monosialotransferrine et DST (glycoformes ayant un pHi supérieur à 5,7) définissait la CDT par le pourcentage de ces deux formes par rapport à la transferrine totale [2]. Plus récemment, cette définition a progressivement été remplacée par la seule DST [3].

Sa structure primaire correspond à la transferrine, protéine monocaténaire globulaire contenant des glucosides ramifiés.

La masse moléculaire de cette bêtaglycoprotéine est de 80 kDa environ. Sa chaîne polypeptidique est formée de 679 acides aminés [4]. La molécule est divisée en deux domaines globulaires : N-terminal (résidus 1–336) et C-terminal (résidus 337–679).

La molécule présente plusieurs niveaux d'hétérogénéité. Le premier concerne la séquence en amino-acides. Il y a en effet, des substitutions d'un ou plusieurs acides aminés dans la séquence, conséquence d'un polymorphisme génétique important d'une vingtaine d'isotransferrines. Parmi elles, il y a trois sous-types (types B, C et D) principaux. Le type C est considéré comme le type de référence pour les études car il est présent chez plus de 90 % de la population caucasienne. Le type B est caractérisé par un point isoélectrique plus faible que celui du C. Le type D a un point isoélectrique plus élevé.

Le domaine C-terminal comprend deux chaînes glycaniques fixées sur des résidus asparagine aux positions 413 et 611. Ces deux chaînes peuvent être bi-, tri- ou tétra-antennées ce qui sera responsable de la deuxième cause d'hétérogénéité de cette glycoprotéine. Chaque chaîne est composée de deux résidus N-acétylglucosamine portant un mannose. Deux autres mannoses sont le support des trisaccharides terminaux, composés d'un résidu N-acétylglucosamine, un galactose et un acide sialique terminal. La molécule possède donc en théorie de zéro à huit acides sialiques. Dans la réalité, seules les fractions

comportant au plus six acides sialiques peuvent être observées. L'isoforme dominante dans le sérum est la tétrasialylée. L'addition ou la perte d'un résidu acide sialique conduira à une variation du point isoélectrique (pI) d'environ 0,1 unité. La réduction du contenu protéique en acide sialique rend la transferrine moins négativement chargée, particularité qui est mise à profit dans les méthodes de dosage qui séparent les diverses formes de CDT en fonction de leur pI. Les formes di-, mono- et a-sialylées ont des pI respectifs de 5,7, 5,8 et 5,9 alors que la forme dite « normale » tétrasialylée a un pI de 5,4.

Le troisième facteur d'hétérogénéité est le contenu en fer de la transferrine qui possède deux sites de fixation des atomes de fer. Il y a par conséquent quatre formes de transferrine, l'apotransferrine dépourvue d'atome de fer, deux transferrines monoferriques dont le pI est identique et la transferrine contenant deux atomes de fer.

La combinaison des trois niveaux d'hétérogénéité que nous venons de rappeler, conduit à de nombreuses formes de transferrine (près de 40). Seule l'hétérogénéité associée au contenu en acide sialique est influencée par la consommation d'alcool. Ces rappels sur la structure nous expliquent pourquoi il conviendra de procéder à une saturation en fer de la molécule pour pouvoir quantifier les différentes formes uniquement selon leur degré de sialylation mais également quelles seront les méthodes permettant le dosage des fractions différemment sialylées.

Données physiopathologiques

Le site de production et de sécrétion des CDT est le foie. L'alcool ne semble pas affecter directement la synthèse de la chaîne polypeptidique elle-même car on n'observe pas de modification quantitative de la transferrine sérique chez les sujets consommateurs excessifs d'alcool, tandis qu'elle est augmentée dans les stéatoses alcooliques et diminuée dans les cirrhoses alcooliques. La synthèse des chaînes de glycanes s'effectue dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes, puis la chaîne est transférée sur le polypeptide. Dans l'appareil de Golgi, le glycanes est modifié et allongé sous l'action des N-acétylglucosaminyl transférases I, II et IV, de galactosyl transférases et de sialyl transférases [5].

Si l'alcool ne modifie pas la synthèse de la chaîne polypeptidique, en revanche, la glycosylation est affectée par la surconsommation d'alcool en raison d'actions sur les systèmes enzymatiques de glycosylation post-traductionnels. Les activités mannosyl, galactosyl et sialyl transférases hépatiques sont diminuées [6], de même que l'activité galactosyl transférases du sang. L'acétaldéhyde issu de la dégradation de l'éthanol est également impliqué dans ces transformations. Il induit une diminution de l'activité galactosyl transférases de l'appareil de Golgi dès la concentration de 200 $\mu\text{mol/L}$. Une augmentation de l'activité sialydase a été observée au niveau de la membrane de l'hépatocyte en présence d'alcool. Cette augmentation pourrait être à l'origine d'une désialylation partielle de la transferrine avant sa sécrétion dans la circulation sanguine.

L'alcool est également impliqué dans les processus de capture cellulaire et de catabolisme de la transferrine. En

effet, la désialylation est la première étape du catabolisme qui conditionne son élimination. Le catabolisme de la transferrine est assuré via deux types de récepteurs. La transferrine di-ferrique se fixe à son récepteur spécifique, qui a une forte affinité pour les chaînes bi-antennées terminées par deux résidus acide sialique. Le complexe est internalisé, le fer séparé de la transferrine et cette dernière est recyclée avec son récepteur puis externalisée. Les récepteurs des asialoglycoprotéines sont également impliqués dans la capture de la transferrine par les hépatocytes, ils reconnaissent le galactose, la N-acétylglucosamine ou le mannose comme sucre terminal. La compétition entre les deux types de récepteurs conduit à une sélectivité dans les formes de transferrine présentes dans le sérum. Les transferrines comportant trois acides sialiques ou plus sont métabolisées normalement car une des branches comporte deux acides sialiques terminaux. La disialotransferrine est reconnue par les récepteurs spécifiques lorsque ses deux résidus acide sialique sont situés sur la même chaîne glycanique, tandis que l'existence de deux chaînes glycaniques portant chacune un acide sialique conduit à une molécule captée par des récepteurs conduisant à une élimination. Le métabolisme sera modifié lorsque le seuil de 50 g par jour d'alcool est dépassé. Cette quantité est atteinte dès la consommation quotidienne d'une bouteille de vin de 0,75 L titré à 12°C d'alcool.

La vitesse de décroissance de la CDT dans le sang après sevrage alcoolique montre une demi-vie d'environ 14 à 17 jours, identique à celle de la transferrine « normale ».

Rappelons l'importance du problème lié à l'abus de la consommation d'alcool. En effet, en France, il faut savoir que 3 % de la population est alcoolique avec des symptômes physiques de dépendance, mais l'on estime qu'il y a 6 % de la population que l'on peut classer dans les buveurs excessifs, dépassant le seuil de consommation de 50 g d'alcool journalièrement.

Dosage de la transferrine désialylée

Préanalytique

Les conditions de prélèvement requises sont exclusivement d'effectuer la prise de sang sur tube sec. L'analyse sera pratiquée sur le sérum. L'EDTA comme l'héparine peuvent modifier le pI des glycoprotéines. Ils peuvent aussi perturber l'étape de préparation au dosage qui va consister à saturer les différentes transferrines par un sel de fer. De même, d'une manière générale, le sérum est préconisé pour la réalisation des techniques par électrophorèse. Les échantillons centrifugés peuvent être conservés sept jours entre 2 et 8 °C. Au-delà de ce délai, il convient de les conserver congelés entre -18 et -22 °C.

Techniques de dosage de la transferrine désialylée

Les techniques de dosage ont été nombreuses au cours de ces trois dernières décennies. Elles font appel à des principes de méthodes très différents que nous rappelons succinctement ici.

La focalisation isoélectrique

Elle a été la première technique utilisée pour mettre en évidence et quantifier la CDT. Cette technique présente l'avantage de visualiser chaque fraction, mais ne se prête guère à un usage en routine. Elle permet la caractérisation et l'étude des variants génétiques de la transferrine. Cela reste une de ses principales applications. Elle est de faible reproductibilité [7], ce qui la rend inutilisable en routine.

La chromatographie d'échange d'ions sur colonne

Depuis le début des années 1980, les premières méthodes apparues étaient en deux étapes : séparation des isoformes de CDT, puis dosage de la transferrine dans les fractions les contenant. Elles utilisaient des micro-colonnes échangeuses d'ions à usage unique pour séparer les isoformes de transferrine afin de recueillir la fraction CDT, puis dosage immunologique de la transferrine dans cet éluât. Ce dosage pouvant s'effectuer à l'aide d'un traceur radioactif [8]. Deux kits principaux ont été commercialisés dans les années 1990 et début 2000, CDtect™ (Pharmacia & Upjohn) et Axis % Tranferrine désialylée™ (Axis Biochemical). La différence entre ces deux kits, qui tous deux mesuraient en principe la quantité de di-, mono- et asialotransferrine sérique, est que le premier rendait des résultats en valeur absolue alors que le second exprimait le pourcentage de CDT par rapport à la transferrine totale. Une des limites de ces techniques résidait dans la séparation incomplète de la trisialo-transferrine (TST), entraînant une interférence gênante lorsqu'elle était augmentée. Dans l'éluât, la transferrine pouvait aussi être dosée par une méthode immunoturbidimétrique [9], immunoenzymatique [10] ou immunonéphélométrique [11]. Les résultats étaient le plus souvent exprimés en pourcentage de transferrine totale ou en unités pondérales. Les valeurs seuils ont été établies pour des sujets homozygotes de type C. Les variants B ont une CDT plus faible et les variants D, une CDT augmentée avec ce type de méthode pouvant les faire considérer à tort comme des faux positifs.

Une étude multicentrique française en 2007 avait montré que les résultats des trousses utilisant la chromatographie sur colonne fournissaient des résultats fiables [12]. Il n'existait en particulier que peu de divergences majeures d'un site à l'autre, ce qui est important eu égard à l'utilisation principalement judiciaire de cet examen dans le cadre du maintien ou pas du retrait du permis de conduire pour conduite en état alcoolique. Pour l'une des applications testées dans l'étude, une meilleure reproductibilité était souhaitable. Selon les auteurs de cette étude [12], une meilleure harmonisation des résultats, évitant l'utilisation de valeurs de références différentes selon les kits, serait également un progrès. Cet objectif a pu être atteint au cours de l'année 2010 grâce aux efforts d'un groupe de travail, sous l'égide de la Fédération internationale de chimie clinique (IFCC). De très nombreux travaux ont été réalisés pendant plus dix ans avec ces techniques. Elles sont maintenant abandonnées à causes de leur faible praticabilité, une reproductibilité limitée dans certains cas notamment ceux liés à la difficulté de séparation de la TST dont une partie était parfois incluse dans la fraction CDT. Des interférences par l'hémolyse pouvaient se produire avec ces kits.

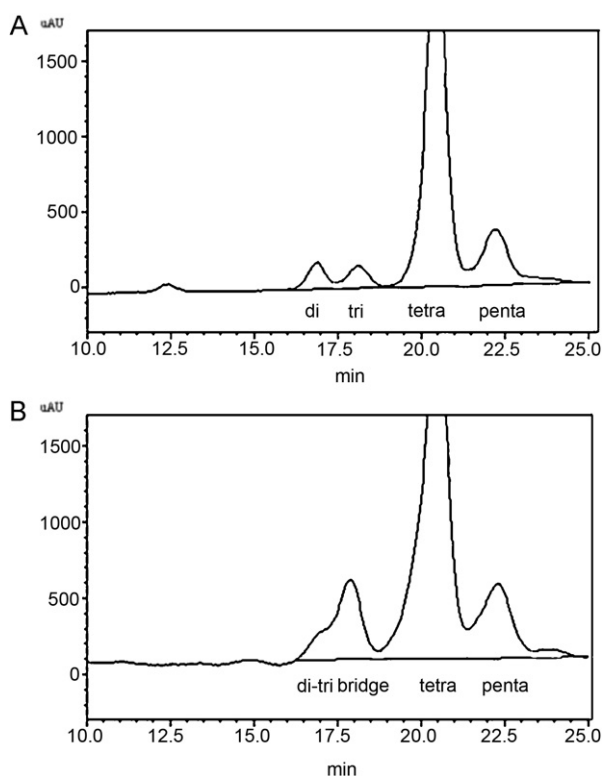


Figure 1 A. Chromatogramme obtenu par chromatographie liquide haute performance dans le cas d'un sujet normal présentant une bonne séparation des fractions disialotransferrine et trisialo-transferrine. B. Chromatogramme présentant le phénomène de *di-tribridging* avec un pic de trisialo-transferrine anormalement augmenté masquant en partie le pic de disialotransferrine et empêchant une quantification exacte de la fraction disialotransferrine.

Chromatographie liquide haute performance

Des techniques utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP) ont été mises au point plus récemment. Elles offrent l'avantage d'identifier chaque fraction séparément. Les fractions retenues comme la CDT sont exclusivement la DST. Les fractions mono- et asialylées sont en concentration trop faibles pour avoir un intérêt dans le dosage [13,14]. La quantification se fait par la mesure de l'absorbance du complexe fer-transferrine vers 460 nm, longueur d'onde de détection qui rend ces méthodes plus spécifiques. Les résultats sont exprimés par le pourcentage de transferrine totale après intégration des surfaces des différents pics. Ces techniques permettent l'individualisation de chaque fraction (Fig. 1a) et donc la mise en évidence de variants génétiques reconnaissables selon leurs temps de rétention. Cette technique performante a été proposée comme technique de référence [3]. Elle doit par conséquent être mise en œuvre pour confirmer les résultats d'autres techniques qui paraissent discordants ou ininterprétables. Un exemple de chromatogramme d'un sujet normal est présenté sur la Fig. 1a. Cependant chez certains patients cirrhotiques ou porteur d'autres atteintes hépatiques [15], la séparation entre la TST et la DST peut être incomplète ou absente ce qui est une source d'imprécision ou parfois même d'impossibilité du dosage précis de la CDT. Cette interférence dénommée *di-tribridging* (pontage entre la DST

et TST) n'est pas simple à contourner. Un exemple de ce type de profil est présenté sur la Fig. 1b. La mise en œuvre d'une autre méthode peut permettre parfois une résolution de cette difficulté. Si cela n'est pas réalisable, le résultat de CDT ne doit pas être rendu et être remplacé par le commentaire : « examen irréalisable en raison de l'atteinte hépatique du patient ».

Cette interférence a été récemment explicitée [16]. Elle est associée, dans la majorité des cas, à des altérations de la glycosylation de la transferrine. Celle-ci contiendrait une plus grande proportion de formes tri-antennées et souvent de résidus d'oligosaccharides N-fucosylés. D'après les auteurs, ces résultats peuvent être importants pour de futures approches diagnostiques des maladies hépatiques. Des interférences par l'hémolyse peuvent aussi se produire avec des échantillons très hémolysés lorsque la concentration d'hémoglobine libre du sérum dépasse 2 g/L. De tels cas sont généralement très rares en pratique.

Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire a aussi été proposée comme technique applicable en routine, avec une détection par l'absorbance des protéines à 200 nm [17,18]. Le handicap représenté par les étapes préalables de purification de la transferrine avant son dosage qui rendait les techniques par chromatographie sur colonne unitaire, longues et délicates à mettre en œuvre, est ainsi résolu. En effet, de récents développements dans les années 2000, ont permis la vulgarisation de l'électrophorèse capillaire automatisée. Cette technique gagne régulièrement du terrain par le fait que cet équipement est présent dans la grande majorité des laboratoires [19]. Les résultats d'une étude récente [20] démontrent que la méthode Capillarys CDT (Capillarys™ Sebia, Evry, France), est robuste et reproductible en routine (CV de reproductibilité inférieure à 2 %) et transférable d'un laboratoire à l'autre utilisant le même appareil. De plus, elle est fortement corrélée à la méthode de CLHP [21]. Deux exemples de profils d'électrophorèses, normal et pathologique sont présentés sur la Fig. 2. Cependant, cette méthode n'échappe pas au phénomène de *di-tribridging* que nous avons explicité au paragraphe précédent. Sa spécificité est moindre que celle par CLHP en raison du choix de la longueur d'onde de lecture (200 nm) et de la co-migration possible d'autres protéines telles des immunoglobulines complètes et les chaînes légères monoclonales. En effet, le dosage de la CDT par électrophorèse capillaire peut être perturbé dans les échantillons contenant de grandes concentrations d'immunoglobulines et/ou des chaînes légères libres monoclonales chez des patients porteurs d'une gammapathie monoclonale bénigne ou maligne. L'intérêt de la trousse commerciale d'immuno-soustraction Capillarys™ CDT/IS (Sebia) sur des sérums présentant des anomalies du protéinogramme dans la zone des bêta- et gammaglobulines susceptibles d'interférer avec le dosage de la CDT a été évalué [22]. L'immuno-soustraction rend interprétables 77 % des échantillons traités, contre 40 % avant traitement. Les échantillons restant ininterprétables peuvent être expliqués par des immunoglobulines présentes à une concentration supérieure à 60 g/L, dépassant le seuil de saturation du sérum tétravalent ou par une concentration en complément C3 natif et dégradé créant des pics

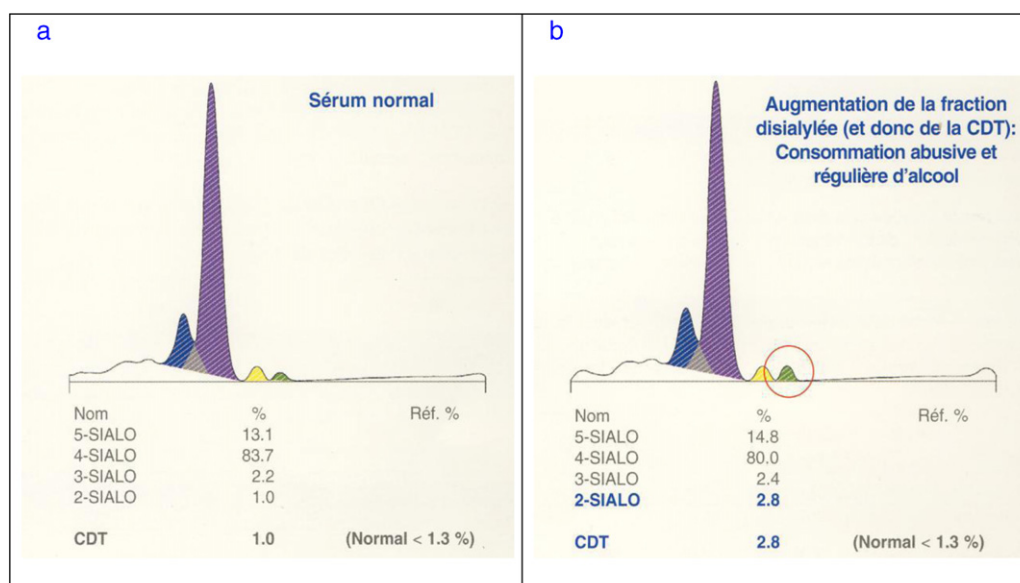


Figure 2 Profils d'électrophorèse capillaire des isotransferrines séparées selon le degré de sialylation. a : profil normal transferrine désialylée = 1 % ; b : profil pathologique transferrine désialylée = 2,8 %.

surnuméraires. Par ailleurs, les profils analysés comme variants par le logiciel nécessitent une confirmation par la technique de CLHP.

Méthodes directes spécifiques

Ces méthodes utilisent des anticorps monoclonaux spécifiques de la CDT humaine. La méthode N Latex CDT™ kit Siemens [23] est le premier dosage immunologique direct permettant de déterminer le pourcentage de CDT dans le sérum. La spécificité du N Latex CDT pour identifier l'abus d'alcool peut être plus élevée que pour les techniques qui utilisent la CLHP parce que les variants génétiques de la transferrine n'interfèrent pas avec les mesures. Elle met en jeu la compétition entre des particules de latex marquées par la CDT et la CDT du patient pour un anticorps monoclonal anti-CDT. Cette méthode a montré une bonne spécificité et des performances acceptables en routine avec des valeurs de référence de 1,19 à 2,47%. Le 97,5^e percentile est établi à 2,35%. Les interférences signalées concernent la présence de particules ou d'un trouble dans le sérum. Par conséquent, les échantillons lipémiques qui ne peuvent être clarifiés, ne peuvent pas être dosés par cette technique.

Nature de la molécule utilisée pour la calibration

Au cours des premières années du dosage de la CDT, certaines des méthodes exprimaient les résultats de CDT en mg/L ou en U/L grâce à un étalon préparé à partir de sérums humains purifiés et lyophilisés. Pour les techniques qui exprimaient les résultats en pourcentage de CDT, elles n'utilisaient pas d'étalon dans la mesure où les résultats étaient exprimés en valeurs relatives. Plus récemment, une méthode de préparation d'un étalon primaire a été élaborée afin de permettre aux industriels de préparer les étalons secondaires indispensables pour une bonne harmonisation

des résultats par les différentes méthodes commercialisées [15]. Cette harmonisation devrait être effective à partir des années 2012–2013.

Mode d'expression des résultats et valeurs de référence

L'hétérogénéité des modes de résultats pouvant être exprimée en valeur absolue (mg/L, U/L ou unités d'absorbance) ou en valeur relative (pourcentage de CDT par rapport à la transferrine totale ou rapport CDT/tétrasilotransferrine) n'a pas aidé cet examen à s'imposer d'emblée. Cela, d'autant plus que les valeurs de référence étaient très différentes en fonction des méthodes [24]. Comme les techniques diffèrent par le principe de séparation, les fractions prises en compte pour la quantification de la CDT étaient variables. Pour mémoire, les valeurs seuils s'échelonnaient de 9 à 100 mg/L pour les techniques exprimant la CDT en valeur absolue et de 0,8 à 8,4% pour celles l'exprimant en valeur relative. Cette dispersion des méthodes et de l'expression des résultats a été un frein pour l'utilisation pertinente de cet examen de biologie médicale. Les travaux d'un groupe international ont fort utilement permis d'améliorer la situation à partir de l'année 2007 [3]. Ces dernières années, la proposition d'un matériel de référence correspondant à la DST et le mode d'expression des résultats en pourcentage DST/Transferrine totale pour l'étalonnage des différentes méthodes (CLHP, électrophorèses capillaires, immunologiques) a conduit à réduire significativement la dispersion des résultats des contrôles de qualité. Les coefficients de variation toutes techniques pour les 66 laboratoires impliqués dans l'étude, sont passés de 18,9% à 5,5% [15].

Depuis la publication des recommandations internationales [3,15] et avec les méthodes fondées sur la CLHP ou l'électrophorèse capillaire, l'expression en valeur relative est devenue le standard donnant à cet examen les

performances requises pour son utilisation en pratique médicale [19–21].

Valeurs de référence

Pour la technique par électrophorèses capillaire (CapillaryTM CDT et minicapTM CDT Sebia) [20], les résultats sont interprétés en fonction de deux seuil : CDT < 1,3 % : résultat normal ; CDT comprise entre 1,3 et 1,6 % : pas de conclusion possible ; CDT > 1,6 % : résultat anormal.

Pour la technique par HPLC, la limite supérieure de l'intervalle de référence est inférieure à 1,7 % [25,26].

Variations physiopathologiques

Depuis la reconnaissance des méthodes par CLHP comme méthodes de référence, des travaux récents ont considérablement réactualisé les données notamment par le mode d'expression des résultats normalisé en pourcentage de CDT par rapport à la transferrine totale. Ce mode d'expression évite les variations liées à la concentration de celle-ci.

Taux de la transferrine désialylée

Le taux de CDT est indépendant du sexe de l'âge et de l'index de masse corporelle (IMC) [26] chez les sujets ne consommant pas d'alcool. En revanche, il y a une légère différence entre homme et femme chez les sujets ayant une consommation modérée (inférieure à 210 g par semaine chez l'homme et inférieure à 140 g par semaine chez la femme ou élevée d'alcool (consommation respectivement supérieure aux seuils cités), les taux de CDT étant supérieurs chez les hommes. En fonction de l'âge les taux de CDT sont plus élevés dans la tranche 41 à 50 ans, par rapport à celle inférieure à 31 ans chez les buveurs excessifs alors que la consommation pour la tranche d'âge inférieure à 31 ans est plus élevée. Les mêmes auteurs [27] confirment dans une autre étude que le seuil de référence de la CDT ne nécessite pas d'être ajusté, ni en fonction de l'origine ethnique, ni de l'âge, ni du sexe, ni de l'IMC, ni du tabagisme.

Influence de la grossesse

Concernant l'influence de la grossesse, une étude très récente [28] suggère qu'un seuil conventionnel de 1,7 % pourrait être trop faible pour les femmes enceintes et générerait des résultats faussement positifs. Ils proposent qu'un seuil à 2,0 % soit utilisé comme seuil indicatif de consommation d'alcool chez les femmes enceintes. La sensibilité du % CDT à ce seuil pour évaluer la consommation abusive d'alcool pendant la grossesse doit cependant être confirmée par d'autres études.

Anomalies du foie

Les anomalies du foie, mais pas nécessairement la cirrhose, conduisent fréquemment à une séparation chromatographique incomplète des glycoformes de la transferrine, ce qui pouvait autrefois conduire à des résultats faussement

positifs avec les kits CDT. Actuellement, le dosage par CLHP peut détecter ce problème. Cela minimise le risque des faux positifs, mais ne permet pas nécessairement d'aider à la détection valide de consommation abusive d'alcool dans tous ces cas [29]. Une étude de la CDT chez des patients atteints soit d'hépatopathies graves, soit de diabète de type 2, soit ayant une CRP très augmentée, soit traités par des médicaments inducteurs d'enzymes hépatiques, a trouvé une fréquence globale faible de taux élevés de CDT dans ces différentes circonstances cliniques. Les publications précédentes (avant 2007) rapportant de fréquents résultats faussement positifs de CDT semblent donc être liées à la méthode d'analyse utilisée plutôt que la conséquence de véritables perturbations cliniques ou pharmacologiques [30].

Anomalies génétiques

Certaines anomalies génétiques (variant D de la transferrine [VDT]) caractérisées par des déficits en sialyltransférases avec une nette augmentation des CDT peuvent se rencontrer rarement pour les patients d'origine caucasienne. Enfin, une pathologie congénitale très rare : le CDG syndrome (*carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome* [CDGS]) conduit à des valeurs très élevées de CDT [31].

Performance de la transferrine désialylée pour le dépistage des sujets buveurs excessifs

De nombreuses études ont été réalisées avant les recommandations du groupe de travail de l'IFCC. Il conviendrait qu'elles soient refaites dans ces nouvelles conditions préconisées. Cela, afin de confirmer précisément la spécificité et la sensibilité du dosage par rapport à d'autres marqueurs plus anciens tels que la gammaglutamyl-transférase (γ GT), l'alanine aminotransférase (ALT) et le volume globulaire moyen (VGM).

Depuis 2007, il y a eu assez peu d'études en vue de la réactualisation des performances cliniques de la CDT. Toutefois, l'étude de Bergström et Helander [26] démontre clairement que la CDT (en pourcentage) dosée par CLHP est l'examen le mieux corrélé avec l'absorption récente et importante d'alcool. Elle est le paramètre ayant le plus de sensibilité pour le diagnostic des sujets buveurs excessifs comparé au dosage de CDT en valeur absolue, à la γ GT et à l'AST.

Intérêt clinique et indications de la transferrine désialylée

Depuis l'observation initiale de Stibler [1], la CDT a supplanté les anciens marqueurs d'alcoolisme car elle a une sensibilité reconnue comme proche de 90 %, bien meilleure que les γ GT et le VGM. De plus, sa spécificité est maintenant admise comme proche de 97 %, également supérieure au VGM et aux γ GT. D'autres avantages ont par ailleurs été mis en évidence. En effet, de nombreuses circonstances sont sans influence sur le taux de CDT contrairement aux γ GT : cirrhose, cancer du pancréas, syndrome hépatique [27], infarctus. De même, la prise régulière de certains

Tableau 1 Comparatif des caractéristiques des marqueurs biologiques utilisés en France, pour le diagnostic et le suivi des patients abuseurs de boissons alcooliques.

	CDT	γ GT	VGM
Sensibilité	39–94 %	34–84 %	15–69 %
Spécificité	82–97 %	11–85 %	26–91 %
Demi-vie (jour)	14–17	14–21	90
Retour à la normale (semaine)	4	8	12
Quantité d'alcool modifiant le seuil normal	50–80 g/jour	80–200 g/jour	Non établi
Durée de la consommation modifiant le seuil	1 semaine	Plus de 2 semaines	Non établi
Interférences	Grossesse VGDT, CDGS	Cirrhose du foie Pancréatite Cholestase, Infarctus Carbamazépine Barbituriques Antidépresseurs Obésité, Diabète Contraceptifs oraux	Déficit en vitamine B12 et folates Pathologies thyroïdiennes Tabagisme Hépatopathies non alcooliques Anémie de Biermer

VGDT : variant génétique D de la transferrine ; CDGS : *carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome*.

médicaments tels que les anticonvulsivants, antipsychotiques, anticoagulants, analgésiques est sans interaction. Il en est de même de la surcharge pondérale, du diabète, du tabagisme, de l'alcoolisation aiguë ponctuelle et de la consommation modérée d'alcool inférieure à 40 g par jour [26].

En revanche, certains facteurs modifient le taux de CDT : la dose consommée régulièrement, la durée entre la dernière consommation et le jour du prélèvement pour l'examen [26]. Par conséquent, les renseignements cliniques précisant ces éléments sont indispensables pour l'interprétation médicale du résultat par le biologiste comme par le médecin. Les principales caractéristiques reconnues des marqueurs biologiques de l'alcoolisme actuellement en usage sont présentées dans le **Tableau 1**.

Indications de l'examen

Le dosage de la CDT est indiqué dans le diagnostic précoce d'une pathologie alcoolique. La CDT est augmentée avant la γ GT. Cela permet de fournir un élément objectif dans les cas de suspicion de problème liés à l'alcool (en tenant évidemment compte des causes de faux positifs). Il peut servir à établir le lien entre les atteintes hépatiques et leurs causes. La précocité de l'augmentation (abus depuis deux semaines avant le prélèvement pour l'examen) peut prévenir les risques pour le patient de devenir alcoolodépendant par une prise en charge précoce. Enfin, cet examen est particulièrement utile pour le suivi des traitements de sevrage, le patient étant son propre témoin pour l'évolution du taux de CDT au fil du temps. Il permettra aussi de détecter précocement (au bout de quelques jours) la rechute. C'est dans ce contexte aussi que les commissions de permis de conduire [32], la médecine du travail, les médecins généralistes et les spécialistes hépatologues ou alcoologues utilisent de plus en

plus cet examen pour le dépistage et la prise en charge des patients buveurs excessifs.

Conclusion

De nombreuses études ont montré que lorsque la consommation quotidienne d'alcool dépasse 50 g par jour il y a inhibition de la sialylation de la transferrine au cours de la biosynthèse hépatique qui conduit à une augmentation de la production de transferrines pauvres en acide sialique dont principalement la DST. Cette inhibition s'exprime au bout d'une semaine par une augmentation du taux de CDT.

La demi-vie de la CDT est de 14 à 17 jours. Le temps qu'il faut pour la normaliser, à savoir un pourcentage inférieur à 1,7 %, varie entre deux et quatre semaines. Les sensibilités et spécificités élevées de l'équilibre réversible des différentes formes de transferrines confèrent à cet examen un grand intérêt dans le suivi médical des patients buveurs excessifs. Principalement trois méthodes coexistent avec des performances variables et complémentaires [33]. Le laboratoire doit préciser la méthode mise en œuvre sur le compte rendu des résultats. Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont celles par EC et par CLHP qui permettent une bonne séparation des iso-formes et leur quantification en pourcentage dans plus de 95 % des cas, grâce à un logiciel adapté. L'interprétation des profils que ce soit par EC ou HPLC par le biologiste est indispensable [33,34] afin d'éviter les pièges de cet examen spécialisé. En effet, un résultat erroné peut avoir des conséquences préjudiciables notamment au plan civil pour le patient (non récupération du permis de conduire). Les méthodes par CLHP sont indispensables dans un but de confirmation des résultats ou lors de circonstances particulières connues chez le patient [33,34]. Il est important que le laboratoire puisse fournir, en cas de besoin, l'estimation de l'incertitude de la mesure de sa

méthode et procéder le cas échéant à une vérification d'un résultat discordant par une méthode de référence.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029–37.
- [2] Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13–7.
- [3] Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Helander A, Wielders JPM, Anton RF, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(4):558–62.
- [4] Schellenberg F, Mouray H. La transferrine déficiente en hydrates de carbone: quoi de neuf 20 ans plus tard? *Ann Biol Clin* 2000;58(3):298–309.
- [5] De Jong G, Van Dijk JP, Van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990;190:1–46.
- [6] Xin Y, Lasker JM, Lieber CS. Serum carbohydrate-deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. *Hepatology* 1995;22:1462–8.
- [7] Godsell PA, Whitfield JB, Conigrave KM, Hanratty SJ, Saunders JB. Carbohydrate deficient transferrin levels in hazardous alcohol consumption. *Alcohol Alcohol* 1995;30:61–6.
- [8] Bell H, Tallaksen CCM, Haug E, Try K. A comparison between two commercial methods for determining carbohydrate deficient transferrin (CDT). *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:453–7.
- [9] Viitala K, Lähdesmäki K, Niemelä O. Comparison of the Axis %CDT TIA and the CDTest method as laboratory tests of alcohol abuse. *Clin Chem* 1998;44:1209–15.
- [10] Vernet M, Renversez JC, Revenant MC, et al. Étude multicentrique du dosage de la transferrine déficiente en acide sialique par deux techniques chromatographiques. *Ann Biol Clin* 1994;52:535–46.
- [11] Schellenberg F, Martin M, Caces E, Bénard JY, Weill J. Nephelometric determination of carbohydrate deficient transferrin. *Clin Chem* 1996;42:551–7.
- [12] Boehrer JL, Cano Y, Capolaghi B, Desch G, Dosbaa I, Estepa L, et al. Validation multicentrique du dosage de la CDT par les méthodes %CDT TIA® et Tina Quant %CDT®. *Ann Biol Clin* 2007;65(2):161–7.
- [13] Heggli DE, Aurebekk A, Granum B, Westby C, Sundrehagen E. Should trisialotransferrin be included when calculating CDT for diagnosing elevated alcohol intake? *Alcohol Alcohol* 1996;31:381–4.
- [14] Schellenberg F, Mennetrey L, Girre C, Nalpas B, Pagès JC. Automated measurement of carbohydrate-deficient transferrin using the Bio-Rad %CDT by the HPLC test on a Variant HPLC system: evaluation and comparison with other routine procedures. *Alcohol Alcohol* 2008;43(5):569–76.
- [15] Helander A, Wielders JP, Jeppsson JO, Weykamp C, Siebelder C, Anton RF, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(11):1585–92.
- [16] Landberg E, Åström E, Kågedal B; et al., Disialo–trisialo bridging of transferrin is due to increased branching and fucosylation of the carbohydrate moiety. *Clin Chim Acta* Available online 7 August 2012. In Press, Uncorrected Proof — Note to users <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.07.026>
- [17] Scott H, Stewart MD, Susana Comte-Walters MS, Emily Bowen MS, Raymond F, Anton MD. Liver disease and HPLC quantification of disialotransferrin for heavy alcohol use: a case series. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34(11):1956–60.
- [18] Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19:3033–9.
- [19] Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F. Fully automated analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clin Chim Acta* 2007;380:4–7.
- [20] Schellenberg F, Wielders JP. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's capillary system: intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off. *Clin Chim Acta* 2010;411(23–24):1888–93.
- [21] Daves M, Cemin R, Floreani M, Pusceddu I, Cosio G, Lippi G. Comparative evaluation of capillary zone electrophoresis and HPLC in the determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(10):1677–80.
- [22] Baraud J, Schellenberg F, Pagès JC. Intérêt de l'immunosoustraction des immunoglobulines et de la transferrine dans le dosage de la transferrine désialylée en électrophorèse capillaire. *Ann Biol Clin* 2009;67(4):451–5.
- [23] Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, et al. Development and multicenter evaluation of the N Latex CDT Direct Immunonephelometric Assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2007;53(6):1115–21.
- [24] Schellenberg F, Dosage de la CDT. L'apport attendu de la standardisation. *Spectra Biol* 2007;161:35–7.
- [25] Helander A, Husa A, Jeppson J-O. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881–90.
- [26] Bergström J-P, Helander A. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (% Disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity, specificity, gender effects, and relationship with other alcohol biomarkers. *Alcohol Alcohol* 2008;43(4):436–41.
- [27] Bergström JP, Helander A. Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: Implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clin Chim Acta* 2008;388(1–2):59–67.
- [28] Bakhireva LN, Cano IS, Rayburn WF; et al., Advanced gestational age increases serum carbohydrate-deficient transferrin levels in abstinent pregnant women. *Alcohol Alcohol* (2012) doi: 10.1093/alcalc/ags087.
- [29] Stewart SH, Comte-Walters S, Bowen E, Anton RF. Liver disease and HPLC quantification of disialotransferrin for heavy alcohol use: a case series. *Alcohol Clin Exp Res* 2010;34(11):1956–60.
- [30] Bergström JP, Helander A. HPLC evaluation of clinical and pharmacological factors reported to cause false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) levels. *Clin Chim Acta* 2008;389(1–2):164–6.
- [31] Stibler H, Blennow G, Kristiansson B, Lindehammer H, Hagberg B. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: clinical expression in adults with a new metabolic disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57(5):552–6.
- [32] Maenhout TM, Baten G, De Buyzere ML, Delanghe JR. Carbohydrate deficient transferrin in a driver's license regranting program. *Alcohol Alcohol* 2012;47(3):253–60.
- [33] Gonzalo P, Pecquet M, Bon C, Gonzalo S, Radenne S, Augustin-Normand C, et al. Clinical performance of the

carbohydrate-deficient transferrin (CDT) assay by the Sebia Capillarys2 system in case of cirrhosis. Interest of the Bio-Rad %CDT by HPLC test and Siemens N-Latex CDT kit as putative confirmatory methods. Clin Chim Acta 2012;413(7–8): 712–8.

[34] Kenan AN, Husand S, Helander A. Importance of HPLC confirmation of problematic carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results from a multicapillary electrophoresis routine method. Clin Chim Acta 2010;411(23–24): 1945–50.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Vascularite cryoglobulinémique et traitement par rituximab

Cryoglobulinemia-vasculitis and rituximab treatment

A. Brignoli^a, L. Musset^{a,*}, M. Miyara^{a,b}

^a Laboratoire d'immunochimie et auto-immunité, département d'immunologie, hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France

^b Service de médecine interne, hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France

Reçu le 24 août 2012 ; accepté le 17 novembre 2012

KEYWORDS

Systemic vasculitis;
Cryoglobulinemia;
Rituximab

MOTS CLÉS

Vascularite
systémique ;
Cryoglobulinémie ;
Rituximab

Summary We reported a case of a 38-year-old woman with systemic vasculitis and mixed cryoglobulinemia in a context of auto-immune disease (Gougerot-Sjögren syndrome) and lymphoma. Different therapeutic strategies, including rituximab, have been proposed in order to control the effect of the systemic vasculitis and evolution of lymphoma. Rituximab is a monoclonal antibody directed against the CD20 molecule on B cells. We discuss the possible side effects of rituximab in this case of mixed cryoglobulinemia vasculitis.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Nous rapportons le cas d'une patiente de 38 ans, suivie pour un syndrome de Gougerot-Sjögren compliqué d'un lymphome B et d'une vascularite systémique cryoglobulinémique. Dans ce contexte, différentes stratégies thérapeutiques sont proposées pour contrôler la maladie auto-immune et notamment la vascularite systémique et pour contrôler le lymphome B. Le rituximab, qui est un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD20 située à la surface des lymphocytes B, est utilisé chez cette patiente. Les effets secondaires du rituximab sont discutés à propos de ce cas particulier de vascularite cryoglobulinémique.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Observation initiale

Mme B., 38 ans, est suivie depuis 2001 pour un syndrome de Gougerot-Sjögren lui-même compliqué, en 2004, d'un lymphome B de la zone marginale à petites cellules traité par Chloraminophene®. En novembre 2009, elle est hospitalisée

dans un service de médecine interne pour une altération de l'état général accompagnée d'un purpura pétéchial diffus, d'adénopathies périphériques et médiastinales entrant dans le cadre d'une ré-évolution du lymphome B. Elle présente par ailleurs des troubles respiratoires caractérisés par une hypoxémie et un syndrome interstitiel radiologique. Un œdème aigu pulmonaire est éliminé devant une échographie cardiaque normale. Une antibiothérapie probabiliste est démarrée malgré l'absence de documentation bactériologique. Les examens biologiques pratiqués à l'arrivée dans

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lucile.musset@psl.aphp.fr (L. Musset).

le service de médecine interne mettaient en évidence une anémie et une thrombopénie avec, au frottis sanguin, la présence de rouleaux d'hématies et d'agrégats plaquettaires. Elle présentait également une insuffisance rénale aiguë (créatinine à 150 µmol/L et une clairance de la créatinine à 44 mL/min) avec une protéinurie importante à 3 g/24 h sans anurie. Une biopsie cutanée des lésions purpuriques a objectivé la présence d'une vascularite avec thromboses fibrino-cruoriques et leucocytoclasie rendant probable le diagnostic de vascularite cryoglobulinémique, bien qu'une recherche de cette cryoglobuline sérique n'ait pas été réalisée à cet instant précis.

Prise en charge et évolution

Des échanges plasmatiques associés à un traitement par corticoïdes à forte dose (methylprednisolone) ont été décidés du fait du retentissement rénal et pulmonaire de la vascularite systémique nécessitant pour leur réalisation un transfert dans un service de réanimation, fin novembre 2009, soit deux semaines après son arrivée dans le service de médecine interne.

La recherche de cryoglobuline sérique pratiquée à son arrivée en réanimation avant les échanges plasmatiques s'avère positive au taux de 1 g/L avec, à l'immunofixation, la mise en évidence d'une IgM kappa monoclonale associée à des IgG polyclonales confirmant le diagnostic initialement suspecté de vascularite cryoglobulinémique. Il s'agit donc d'une cryoglobuline mixte de type II, dont les causes les plus fréquentes sont l'hépatite virale C, les syndromes lymphoprolifératifs et les maladies auto-immunes systémiques dont le syndrome de Gougerot-Sjögren [1–3]. La sérologie du virus de l'hépatite C est négative. Une biopsie ganglionnaire confirme le diagnostic de lymphome B évolutif, de bas grade rendant la vascularite cryoglobulinémique secondaire à l'évolutivité du lymphome B. Un traitement étiologique par une chimiothérapie de type R-CHOP (rituximab associé à cyclophosphamide, hydroxyadriamycine, oncovin, prednisone) est instauré le 29 novembre 2009.

Deux jours après l'administration de la polychimiothérapie associée au rituximab, la patiente présente une nouvelle détresse respiratoire dévoilant une hémorragie intra-alvéolaire. Les étiologies évoquées sont alors une évolutivité de la vascularite cryoglobulinémique ou une toxicité pulmonaire du rituximab (déjà décrit [4]). Un traitement par corticoïdes (methylprednisolone) pendant trois jours est à nouveau administré avec une évolution rapidement favorable sur le plan respiratoire, permettant son retour en médecine interne. Au huitième jour après la chimiothérapie, la patiente présente une agranulocytose fébrile, traitée par triple antibiothérapie, et une détresse respiratoire aiguë nécessitant un nouveau transfert en réanimation à la mi-décembre 2009. La recherche de la cryoglobulinémie est alors négative.

Dans les suites, la patiente reste hypoxémique malgré une ventilation invasive mécanique par intubation trachéale et des séances d'échanges plasmatiques pratiquées tous les deux jours. La mise en place d'une *extra corporal membrane oxygenation* (ECMO) est alors décidée devant la dégradation de l'hématose. Une seconde cure de R-CHOP est administrée

le 23 décembre 2009, mais la patiente développe rapidement un choc septique fulminant et décède le 31 décembre 2009.

Point de vue du biologiste

Les cryoglobulines sont des protéines sériques, principalement des immunoglobulines, qui précipitent à une température inférieure à 37 °C et qui se resolubilisent après réchauffement à 37 °C. Leur mise en évidence est toujours un « défi » pour le biologiste. En effet, les conditions préanalytiques (prélèvement, coagulation et centrifugation à 37 °C, puis séparation rapide du sérum et conservation pendant huit jours à 4 °C) et les conditions analytiques (purification du précipité à +4 °C et son identification à 37 °C) sont difficiles à contrôler et doivent absolument être respectées pour le rendu d'un résultat fiable [5,6].

L'analyse d'une cryoglobulinémie comprend plusieurs étapes :

- le dépistage : pour lequel 10 mL de sang au minimum sont nécessaires. Dès le prélèvement, les tubes doivent être conservés à 37 °C jusqu'à coagulation complète (environ deux heures), centrifugés à 37 °C (dix minutes à 3000 tours/min), puis immédiatement décanté et le sérum est alors conservé à +4 °C pendant huit jours en présence d'un antiseptique (azide de sodium à la concentration finale de 1 pour 100). On recherche la présence ou non d'un cryoprécipité, celui-ci pouvant être d'aspect et d'abondance variables (aspect dit de mie de pain, de flocons, ou de gel). Ce cryoprécipité sera ensuite purifié, puis dosé et identifié ;
- l'identification est généralement réalisée par immunofixation à 37 °C à partir du cryoprécipité purifié. Elle permettra de déterminer le type immunochimique de la cryoglobuline selon les critères de classification proposés par Brouet et al. en 1974 [1] et qui sont toujours d'actualité. Trois types ont été individualisés. Les cryoglobulines de type I sont constituées d'une immunoglobuline monoclonale unique. Les cryoglobulines mixtes sont constituées d'immunoglobulines polyclonales associées (type II) ou non (type III) à une immunoglobuline monoclonale. Les cryoglobulines de type I sont généralement abondantes (> 1 g/L), et observées au cours de pathologies lymphoprolifératives (myélome multiple ou maladie de Waldenström). Les cryoglobulines de type II et III, dites mixtes, sont moins abondantes (souvent < 1 g/L) et sont associées à diverses pathologies. Elles sont parfois retrouvées au cours de syndromes lymphoprolifératifs (types II) mais surtout au cours de maladies auto-immunes systémiques (syndrome de Gougerot-Sjögren, lupus érythémateux systémique), d'infections virales chroniques (hépatite C principalement) et d'hépatopathies chroniques [1–3]. Ces cryoglobulines mixtes de type II ou III sont généralement constituées d'immunoglobulines G ou M à activité facteur rhumatoïde (activité anti-IgG). Ces Ig (monoclonales ou non) à activité anti-IgG seraient potentiellement impliquées dans la toxicité du rituximab comme nous le verrons par la suite.

Les cryoglobulines de type II ou III peuvent parfois être asymptomatiques et sans étiologie apparente : on les appelle cryoglobulinémies mixtes essentielles. La présence d'une cryoglobuline (surtout de type I ou II, car ce sont les plus abondantes) peut perturber certains examens biologiques [6]. En effet, des anomalies hématologiques peuvent être observées (vitesse de sédimentation fluctuante entre deux prélèvements, fausses hyperleucocytose et hyperplaquettose) mais également biochimiques et/ou immunologiques (variations inexplicables des constantes biologiques telles que la protidémie par exemple, hypocomplémentémie, sous-estimation du facteur rhumatoïde). Dans le cas de cette patiente, les arguments cliniques (purpura pétechial diffus), l'histologie des lésions purpuriques et l'observation sur le frottis sanguin de rouleaux d'hématies et d'agrégats plaquettaires avaient amené les médecins du service de médecine interne à suspecter et rechercher la présence d'une cryoglobulinémie.

Point de vue du clinicien

La vascularite cryoglobulinémique de type II est caractérisée par diverses manifestations [1–3] :

- cutanées (purpura vasculaire nécrotique, urticaire au froid, ulcères) ;
- vasomotrices (syndrome de Raynaud, acrocyanose, livedo reticularis) ;
- rénales (glomérulonéphrite membrano-proliférative, insuffisance rénale) ;
- articulaires (arthralgies) ;
- neurologiques (polynévrites et autres neuropathies périphériques) ;
- et plus rarement pulmonaires (hémorragie intra-alvéolaire) et cardiaques (péricardite).

Le traitement à mettre en œuvre est avant tout étiologique [3], comme cela a été le cas ici avec la mise en route d'une corticothérapie pour le syndrome de Gougerot-Sjögren et de R-CHOP pour le lymphome B. Le traitement de la vascularite liée à la présence de la cryoglobuline dans la circulation comprend, devant des atteintes sévères comme les complications rénales, la mise en route d'échanges plasmatiques associés à des bolus de corticoïdes. Notons qu'idéalement les tubulures des circuits d'échange doivent être réchauffées afin d'éviter la précipitation de la cryoglobuline extracorporelle qui peut empêcher le bon déroulement des échanges plasmatiques.

Rituximab

Le rituximab (Mabthera®) est un anticorps monoclonal chimérique IgG dirigé contre la molécule CD20 qui est exprimée à la surface des lymphocytes B. Il a pour indication principale le traitement des lymphomes mais il est aussi prescrit dans les maladies auto-immunes systémiques comme le syndrome de Gougerot-Sjögren [7,8]. Il a récemment prouvé son efficacité dans les vascularites cryoglobulinémiques de type II [9] à la posologie de 375 mg/m² par semaine pendant quatre semaines consécutives. Les principaux effets

indésirables rapportés sont une intolérance, une neutropénie retardée et plus rarement une pneumopathie interstitielle et des hémorragies intra-alvéolaires [4]. Dans ce cas clinique, on peut se poser la question de la responsabilité du rituximab dans la survenue de l'hémorragie intra-alvéolaire. Néanmoins, le mécanisme étiopathogénique n'est pas clair. Selon une étude [10], le rituximab peut former un complexe avec la cryoglobuline IgM kappa (complexe *pancake like*) du fait de l'activité facteur rhumatoïde de la cryoglobuline (IgM reconnaissant les IgG au niveau de leur fragment Fc et donc potentiellement le rituximab). Ce phénomène est d'autant plus intense que le taux de cryoglobuline sérique est élevé (supérieur à 1 g/L) et que la posologie de rituximab administrée est forte. Le mécanisme incriminé est une forte affinité de ce complexe cryoglobuline/rituximab pour le C1q (initiateur de la voie classique du complément), ce qui entraîne une activation de la voie classique et la formation du complexe d'attaque membranaire, générateur d'atteintes vasculaires.

Conclusion

Les vascularites systémiques cryoglobuliniques peuvent survenir en l'absence d'infection par le virus de l'hépatite C, notamment dans le cadre de maladies auto-immunes systémiques et d'hémapathies malignes, avec des complications potentiellement graves. Le diagnostic de cryoglobulinémie doit être évoqué rapidement, en sachant que la détection et le typage de celle-ci nécessite un temps de réalisation d'au moins une semaine. Par ailleurs, l'utilisation du rituximab doit être prudente en cas de cryoglobuline présente à taux élevé.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, et al. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974;57:775–88.
- [2] Cacoub P, Fabiani FL, Musset L, Perrin M, Frangeul L, Leger JM, et al. Mixed cryoglobulinemia hepatitis C virus. *Am J Med* 1994;96(2):124–32.
- [3] Ferri C. Mixed cryoglobulinemia. *Orphanet J Rare Dis* 2008;16:3–25.
- [4] Heresi GA, Faver CF, Stoller JK. Interstitial pneumonitis and alveolar hemorrhage complicating use of rituximab. *Respiration* 2008;76:449–53.
- [5] Laplanche S, Musset L. Recherche et caractérisations des cryoglobulines au laboratoire. *Feuil Biol* 1992;188:29–33.
- [6] Le Carrer D. Les cryoglobulinémies : exploration biologique et signification clinique. *Rev Fr Lab* 1995;279:43–51.
- [7] Grillo-Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M. Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol* 2002;29:105–12.
- [8] Seror R, Sordet C, Guillevin L, Hachulla E, Masson C, Ittah M, et al. Tolerance and efficacy of rituximab and changes in serum B cell biomarkers in patients with systemic complications

- of primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66(3): 351–7.
- [9] Zaja F, De Vita S, Mazzaro C, Sacco S, Damiani D, De Marchi G, et al. Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2003;10:3827–34.
- [10] Sène D, Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Musset L, Cacoub P. Rituximab may form a complex with IgM(mixed cryoglobulin and induce severe systemic reactions in patients with hepatitis C virus induced vasculitis. *Arthritis Rheum* 2009;60: 3848–55.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Syndrome de poly-agglutinabilité des globules rouges associé au lymphome malin non hodgkinien

Poly-agglutination syndrome associated with non-Hodgkin lymphoma

A.I. Rakotoniaina^{a,*}, H. Razafimahefa^b, R. Ramanampamonjy^b,
A.O. Rakoto Alson^a, A. Rasamindrakotroka^c

^a Laboratoire d'hématologie, CHU Joseph Ravoahangy Andrianavalona, Antananarivo 101, Madagascar

^b Médecine interne, service de gastroentérologie, CHU Joseph Raseta Befelatanana, Antananarivo 101, Madagascar

^c Laboratoire d'immunologie, CHU Joseph Ravoahangy Andrianavalona, Antananarivo 101, Madagascar

Reçu le 26 septembre 2012 ; accepté le 2 novembre 2012

KEYWORDS

Poly-agglutinable
erythrocyte
syndrome;
Non-Hodgkin
lymphoma;
Blood grouping;
Transfusion;
Cytopenia

MOTS CLÉS

Poly-agglutinabilité ;
Lymphome malin non
hodgkinien ;
Groupage
érythrocytaire ;
Transfusion ;
Cytopénie

Summary We present a case of poly-agglutinability syndrome associated with non-Hodgkin lymphoma observed in a 45-year-old woman hospitalized for asthenia, pallor, and cervical lymphadenopathy and no fever in previous history. Poly-agglutination syndrome was fortuitously discovered during erythrocyte grouping. Tn poly-agglutination is strongly suspected in pancytopenia, inconclusive bone marrow results and the absence of infection in the patient. This hypothesis could not be confirmed because we did not have lectin *Dolichos biflorus*, *Ulex europaeus*, *Salvia horminum*, *Salvia sclarea* and *Arachis hypogaea* nor treatment with papain nor with polybrene. In our case, the delay between the onset of this poly-agglutinability syndrome and malignant lymphoma has not been established. This possible association, found in this patient, justifies the need for careful clinical observation of patients with syndrome of poly-agglutinability in blood grouping.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Nous présentons un cas de syndrome de poly-agglutinabilité associé au lymphome malin non hodgkinien observé chez une femme de 45 ans hospitalisée pour asthénie profonde, pâleur et adénopathies cervicales. Cela dans un tableau d'apyrexie. Le syndrome de poly-agglutination a été fortuitement découvert lors du groupage érythrocytaire. La poly-agglutination de type Tn est fortement évoquée devant la pancytopénie et le résultat du myélogramme non contributif ainsi que l'absence d'infection chez la patiente. Cette hypothèse n'a pas pu être confirmée car nous ne disposons pas de lectines de *Dolichos Biflorus*, *Ulex europaeus*, *Salvia horminum*, *Salvia sclarea* et *Arachis hypogaea*, ni du traitement avec

* Auteur correspondant. Lot II C 90 Ter Ankadinandriana Ifarihy Ankaraombato, Antananarivo 102, Madagascar.
Adresse e-mail : Paps11380@yahoo.fr (A.I. Rakotoniaina).

la papaine, ni avec le polybrène. Dans notre cas, le délai entre l'apparition de ce syndrome de poly-agglutinabilité et le lymphome malin non hodgkinien n'a pas été établi. Cette association éventuelle, retrouvée chez cette patiente, justifie la nécessité d'une observation clinique attentive des patients présentant un syndrome de poly-agglutinabilité lors du groupage sanguin.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

La poly-agglutinabilité des globules rouges est caractérisée par la présence d'une réaction d'agglutination de ces globules rouges en présence des sérums humains adultes normaux compatibles dans le système ABO. Cette poly-agglutinabilité peut être rencontrée au cours de pathologies infectieuses ou malignes mais aussi chez des personnes non malades. Nous rapportons le cas d'une patiente présentant un syndrome de poly-agglutinabilité associé au lymphome malin non hodgkinien (LMNH).

Observation

Une femme de 45 ans a été hospitalisée au centre hospitalier universitaire Joseph Raseta Befelatanana en juin 2012 pour un problème d'asthénie profonde associée à une pâleur et une poly-adénopathie cervicale, apyrétique. À l'entrée, le résultat de l'hémogramme montre : une anémie régénérative (hémoglobine à 21 g/L ; réticulocyte à 215 G/L), une leucopénie (globules blancs à 1,83 G/L) et une thrombopénie (plaquettes à 108 G/L). Une poly-agglutination des globules rouges a été trouvée lors du groupage érythrocytaire. Le résultat du médullogramme a montré une moelle légèrement hypoplasique avec présence de mégacaryocytes sans infiltration anormale. Sur la biopsie ostéoméduillaire, la moelle est réactionnelle, associée à une myélofibrose.

L'échographie abdominale a mis en évidence une hépatosplénomégalie modérée. Un bilan d'hémostase en vue d'une adénectomie est perturbé (temps de quick à 18,6 secondes et un taux de prothrombine à 56 %). Le résultat de l'examen anatomopathologie du ganglion a conclu à un diagnostic de lymphome non hodgkinien à petites cellules non clivées de type J selon la formulation internationale à usage clinique.

Dans ses antécédents, la patiente a déjà eu en 2003 une adénectomie dont l'examen anatomopathologique concluait à une adénopathie réactionnelle non spécifique. À cette occasion, elle avait eu une transfusion sanguine sans qu'aucun problème de groupage érythrocytaire n'ait été signalé.

Discussion

La poly-agglutination fait partie des difficultés du groupage érythrocytaire. Elle peut être congénitale ou acquise. La poly-agglutination acquise est due à l'exposition des antigènes de type T, Tn, Tk, B acquis et Va à la surface des globules rouges. Ces antigènes sont normalement masqués. L'exposition de ces antigènes peut se produire au cours d'un épisode infectieux ou pré-leucémique ou cancéreux. Elle peut être persistante ou transitoire. La poly-agglutination de type T, Tk, B acquis est d'origine infectieuse. Cependant,

le mécanisme de la poly-agglutinabilité de type Tn n'est pas encore élucidé et contrairement aux autres poly-agglutinabilités, elle n'est jamais d'origine infectieuse.

Chez notre patiente, le syndrome de poly-agglutination a été découvert fortuitement lors d'une détermination de son groupe sanguin. Il s'agit d'un syndrome de poly-agglutination acquis, car neuf ans auparavant, la patiente a déjà eu une transfusion sanguine au cours d'une première adénectomie pendant laquelle aucune difficulté de groupage n'avait été mentionnée. Dans le cas présenté, le syndrome de poly-agglutinabilité est associé au LMNH. Des auteurs ont décrit des cas où le syndrome de poly-agglutination précède de plusieurs années certaines pathologies hématologiques malignes comme la leucémie et le lymphome [1]. Dans notre cas, le temps entre l'apparition de ce syndrome de poly-agglutinabilité et le LMNH n'a pas pu être établi. Le syndrome de poly-agglutinabilité de type Tn doit être fortement suspecté devant la pancytopénie, le résultat non contributif du médullogramme [2] et aussi devant l'absence d'antécédents infectieux chez cette patiente qui était toujours apyrétique. Cette hypothèse que nous avons formulée n'a pas pu être confirmée biologiquement car nous n'avons pas pu disposer des différentes lectines de : *Dolichos Biflorus*, *Ulex europaeus*, *Salvia horminum*, *Salvia sclarea* et *Arachis hypogoea*, ni du traitement avec la papaine, ni avec le polybrène. Le dosage de l'acide sialique n'a pas pu être effectué non plus.

La poly-agglutination de type Tn est due à une modification somatique affectant les cellules souches médullaires. Cette modification entraîne une incapacité de ces cellules souches à produire de la β galactosyl transférase fonctionnelle [3]. Elle est donc responsable des modifications antigéniques d'un ou plusieurs clones de cellules. L'antigène Tn a été largement étudié comme marqueur des cellules tumorales et une exposition de Tn et de sialyl-Tn a été démontrée dans de nombreux cancers [4,5]. Le syndrome hématologique présenté par la patiente est caractéristique du LMNH mais aussi du syndrome de poly-agglutination de type Tn [2]. La patiente, malheureusement perdue de vue, n'a donc pas pu bénéficier du suivi clinique et biologique après la transfusion de globules rouges de groupe O qui lui a été faite au cours de l'hospitalisation. En conclusion, cette association entre LMNH et poly-agglutinabilité retrouvée chez cette patiente justifie la nécessité d'une observation clinique attentive des patients présentant un syndrome de poly-agglutinabilité à l'occasion d'un groupage sanguin.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Beck ML. Red blood cell polyagglutination: clinical aspects. *Semin Hematol* 2000;37(2):186–96.
- [2] Loaiza-Bonilla A, Horowitz D, Sheela S, Baral A, Tinoco G, Kyriakopoulos C. Persistent Tn polyagglutination syndrome during febrile neutropenia: a case report and review of the literature. *J Med Case Reports* 2011;5:8.
- [3] Bigbee WL, Langlois RG, Stanker LH, Vanderlaan M, Jensen RH. Flow cytometric analysis of erythrocyte populations in Tn syndrome blood using monoclonal antibodies to glycophorin A and the Tn antigen. *Cytometry* 1990;11(2):261–71.
- [4] Desai PR. Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfus Med Rev* 2000;14(4):312–5.
- [5] Ness PM, Garratty G, Morel PA, Perkins HA. Tn polyagglutination preceding acute leukemia. *Blood* 1979;54(1):30–4.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques de la déhydroépiandrostérone et de son sulfate

Immunoanalytical characteristics for dehydroepiandrosterone and its sulfate

R. Doggui

Unité études et planification, Institut national de nutrition et de technologie alimentaire, 11, rue Jebel-Lakhdar, 1007 Bab Sâadoun, Tunis, Tunisie

Reçu le 27 avril 2012 ; accepté le 8 mai 2012

KEYWORDS

DHEA assay;
DHEA-S;
Preanalytical conditions;
Analytical performances;
Hyperandrogenism

MOTS CLÉS

Dosage de la DHEA ;
DHEA-S ;
Conditions préanalytiques ;
Performances analytiques ;
Hyperandrogénie

Summary This paper presents the metabolic data of dehydroepiandrosterone and its sulfate. Clinical interest, preanalytical and analytical useful data for result interpretation are also presented.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Cet article passe en revue le métabolisme, l'intérêt physiopathologique, les conditions préanalytiques et les performances analytiques concernant la déhydroépiandrostérone et de son dérivé sulfate.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La déhydroépiandrostérone (DHEA) (en plus de son dérivé sulfaté) est considérée comme une prohormone. Elle fait

partie des paramètres clés pour le diagnostic des désordres androgéniques en complément du tableau clinique. Elle a été très étudiée aussi en raison de sa corrélation avec différentes pathologies chroniques (cancers, maladies cardiovasculaires) et diverses observations physiologiques (stimulation du système immunitaire). En vue d'une interprétation optimale des résultats des dosages, il est nécessaire de connaître le métabolisme de cette hormone et ses

Adresse e-mail : doggui.radhouene@gmail.com

variations physiopathologiques. Rappelons que les méthodes immunologiques utilisées dans la pratique courante pour le dosage peuvent être perturbées par des réactions croisées.

Structure

La DHEA est un stéroïde de formule brute $C_{19}H_{28}O_2$ et de masse moléculaire égale à 288 Da. Cette molécule est également dénommée 3 β -hydroxy-5-androstén-17-one. Le DHEA-S (sulfate de DHEA ou DHEA- SO_4) possède une formule brute $C_{19}H_{28}O_5S$ et une masse moléculaire égale à 368 Da. Leurs structures chimiques respectives sont présentées sur la Fig. 1.

Synthèse de la déhydroépiandrosterone

La formation de la DHEA suit le schéma classique de la synthèse des stéroïdes débutant par le cholestérol provenant des *low density lipoprotein* (LDL). La formation de la prégnénolone et de la 17 α -hydroxypregnenolone est faite sous l'action de la CYP 11A1 et la CYP 17A1. Dans la zone réticulée du cortex surrénalien et plus précisément dans le réticulum endoplasmique, la formation de la DHEA est catalysée par cette même enzyme (CYP 17A1). La DHEA, jouant principalement le rôle de précurseur des hormones androgènes surrénaliennes, est transformée par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) en androstènedione. Aussi bien dans les glandes surrénales (sous l'action de la SULT2A1) que dans certains tissus périphériques (foie, reins), une interconversion de la DHEA en DHEA-S se fait sous l'action

d'une hydroxystéroïde sulfotransférase [1]. Au cours de cette dernière réaction, le cofacteur est le groupement PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfonate) [2]. La sulfotransférase n'est pas spécifique à la DHEA et peut catalyser la même réaction pour d'autres stéroïdes. L'hydrolyse du groupement sulfate est opérée par une sulfatase codée par un gène lié à X. Les différentes étapes de la synthèse sont présentées sur la Fig. 2.

Métabolisme de la déhydroépiandrosterone

La DHEA et la DHEA-S sont des androgènes surrénaliens à faible pouvoir androgène comparé à celui de la testostérone. Le sulfate de DHEA est le stéroïde le plus abondant dans la circulation sanguine. La majeure partie de la DHEA est synthétisée par les glandes surrénales, toutefois une fraction mineure est sécrétée par les gonades, le tractus gastro-intestinal et le cerveau [3]. La principale forme circulante de cette prohormone est la forme sulfatée qui existe à des concentrations nettement supérieures (500 à 1000 fois) à celles de la DHEA. Environ 64% de la DHEA synthétisée quotidiennement sont convertis en DHEA-S chez l'homme et la femme. Cependant, seulement 13% de la DHEA-S produite durant les 24 heures sont convertis en DHEA [4]. Le sulfate de DHEA est véhiculé principalement par l'albumine. De même, pour la DHEA, l'albumine est la principale protéine de transport (90%) et une faible fraction (environ 3%) est véhiculée par la *testosterone binding globulin* (TeBG) [5]. Il existe une autre forme mineure de transport plasmatique de la DHEA, celle méditée par des lipoprotéines : la prohormone est conjuguée à un acide gras (DHEA-AG) par une liaison ester et l'échange entre les différentes lipoprotéines de la DHEA-AG suit un mécanisme *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) indépendant [6]. La lécithine cholesteryl acyl transferase (LCAT) est l'enzyme responsable de la formation de la DHEA-AG, au niveau des *high density lipoprotein*, considérée comme un réservoir supplémentaire pour la formation des estrogènes et des androgènes actifs au niveau des tissus périphériques [7]. L'Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) est une protéine transmembranaire qui s'exprime dans divers tissus biologiques tels que le cerveau, le foie et les reins [8]. Elle semble jouer un rôle primordial dans le passage de la DHEA-S à travers la membrane cellulaire et la barrière hémato-encéphalique, que ce dérivé sulfaté traverse difficilement à l'état natif [9].

La demi-vie de la DHEA-S est élevée, entre huit et dix heures ; pour la DHEA, elle est estimée à seulement à 40 minutes [5]. L'augmentation de la solubilité de la DHEA-S grâce à son groupement sulfate explique l'accroissement de son affinité pour l'albumine, la réduction de sa clairance et par conséquent la diminution de son élimination de la circulation sanguine. Les concentrations sériques élevées en ce dérivé indiquent probablement qu'il s'agit d'un réservoir hormonal [10]. Ces prohormones vont passer vers les tissus périphériques adéquats possédant les enzymes nécessaires où elles seront converties en androgènes actifs et/ou estrogènes. Ces derniers ne passent pas ou peu dans la matrice extracellulaire et dans la circulation générale. Ils exercent leurs actions directement dans le site de production. On parle alors d'un phénomène d'intracrinie

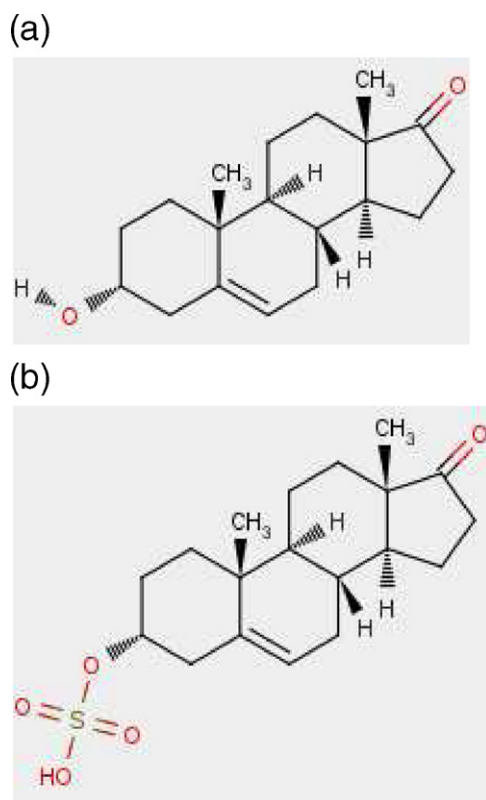


Figure 1 Structure chimique de la déhydroépiandrosterone (DHEA) (a) et son dérivé sulfaté (b).

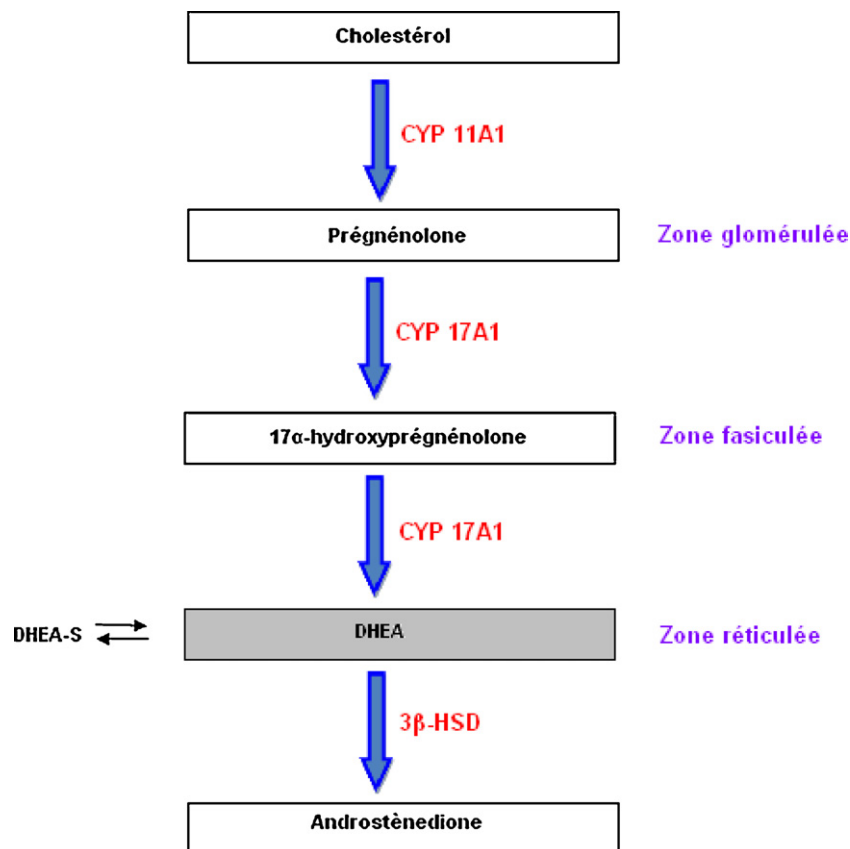


Figure 2 Voie de biosynthèse de la déhydroépiandrostérone (DHEA).

[11]. La synthèse subséquente de la testostérone (androgène) et de l'E1 (estrogène) implique plusieurs enzymes.

La sécrétion de la DHEA et de son dérivé sulfaté débute, vraisemblablement, au cours de la vie fœtale, dès le troisième trimestre de la grossesse. La production maximale est observée vers la fin de la gestation avec un rendement de 200 mg/j [12]. Le fœtus en est le responsable car il possède la batterie enzymatique nécessaire (17-hydroxylase) [13]. Dans le cortex fœtal, la synthèse de la DHEA-S est faite préférentiellement lors de la stimulation directe par la *corticotropin releasing hormone* (CRH) via les récepteurs CRH de type I [14]. Enfin, il existe différents métabolites issus de la biotransformation (principalement hépatique) de la DHEA (éventuellement de la DHEA-S). D'une part, il y a la formation de la Δ^4 -androstènedione qui subit des réactions de réduction en 5α et en 5β . Ces réactions aboutissent respectivement à la formation de l'étiocolanolone (Et) et l'androstérone (An). Ces deux molécules sont les principaux métabolites et ils sont glycu- ou sulfo-conjugués avant leur excrétion urinaire. D'autre part, il y a une réduction de la DHEA en 17α-hydroxy-DHEA ou en 17β-hydroxy-DHEA. L'interconversion entre ces deux formes passe par la formation d'un intermédiaire, le 17-oxo-DHEA. La 7α- et la 7β-hydroxy-DHEA sont des dérivés de la DHEA qui s'interconvertissent entre eux par la formation de la 7-oxo-DHEA sous l'action de la 11α-HDS de type I [3,15]. Il semble que la DHEA-S subit des réactions d'hydroxylation, notamment la 16α-hydroxylation au niveau du foie. Au niveau du placenta, la 16α-hydroxy-DHEA-S, sous l'action d'une

sulfatase, perd son groupement sulfate. La formation de l'estriol s'opère par aromatisation de la 16α-hydroxy-DHEA. Sachant que 90% de l'estriol est produit par l'unité fœtoplacentaire, il représente un excellent indicateur de l'activité métabolique fœtoplacentaire [16]. La 16α-hydroxy-DHEA peut être synthétisée chez la femme dans le tissu mammaire.

Régulation de la sécrétion et variations physiologiques de la déhydroépiandrostérone

La régulation de la sécrétion de la DHEA comporte plusieurs incertitudes. Il est bien établi que les concentrations plasmatiques de la DHEA sont sécrétées en phase avec celles du cortisol en réponse à un stimulus par l'ACTH (hormone adrénocorticotrope) et de la CRH au cours du nyctémère [17,18]. Mise à part la régulation hypothamohypophysaire (systémique), il existe un certain nombre d'autres éléments. Les récepteurs à cytokines s'expriment de manière plus abondante dans la zone réticulée [19]. Cette zone elle-même est le siège d'infiltration par les macrophages [20]. Ces migrations des macrophages apparaissent à un âge relativement précoce au cours du développement [21]. Par la production de l'interleukine 6 (IL-6) et la sécrétion de la *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), les macrophages et les cellules de la zone réticulée contribuent à la régulation locale de la synthèse de la DHEA. Il semble que l'IL-6 stimule la sécrétion de la DHEA [18,22], et il a été constaté que chez les

patients ayant une hyperprolactinémie, les taux de DHEA-S baissent [23]. Au contraire, la Growth Hormone (GH, ou hormone de croissance) semble avoir un effet permissif avec l'ACTH et stimule la sécrétion des androgènes [24].

À la naissance, les concentrations de la DHEA et son dérivé sulfaté sont élevées et sont supérieures à celles de l'adulte normal. Elles baissent de manière très significative au bout du premier mois. Durant les années suivantes et jusqu'à six ans, les concentrations continuent à baisser en parallèle à une involution de la surrénale fœtale [25]. Entre six et sept ans, les concentrations de la DHEA ré-augmentent chez les deux sexes [25], de façon similaire [26]. L'élévation de la sécrétion des stéroïdes C19, en particulier la DHEA et la DHEA-S, est accompagnée d'une expansion de la zone réticulée correspondant à l'adrénarchie [27]. Toutefois, l'analyse du profil urinaire de la DHEA et de ses métabolites indique que l'adrénarchie est un processus continu et qu'il débute depuis la naissance [28]. Les changements biochimiques les plus remarquables au cours de cette phase pré-pubertaire est une expression des enzymes responsables de la synthèse des androgènes surrénaliens. Une expression de la SULT2A1 et de la CYPB5 contre une régression de la 3β -HSD [29]. Le pic maximal des concentrations de la DHEA et la DHEA-S est observé entre 20 et 30 ans ; au-delà de la troisième décennie, les concentrations déclinent progressivement. Un abaissement de 70 à 74 % est observé respectivement pour le sexe masculin et féminin dans la catégorie d'âge comprise entre 50 et 60 ans par rapport aux concentrations optimales observées entre 20 et 30 ans [30]. Chez la femme enceinte, la concentration de la DHEA-S est abaissée environ trois fois par rapport aux concentrations retrouvées au début de la gestation [31].

Les concentrations plasmatiques de la DHEA-S présentent une variabilité selon les saisons avec un pic au printemps et en hiver [32]. Enfin, la DHEA-S plasmatique présente une variabilité intra- et inter-individuelle respectivement de l'ordre de 7,1 % et 21 % [32].

Valeurs usuelles de la déhydroépiandrosterone

À la naissance et durant les premières semaines, les concentrations de la DHEA restent très élevées. Ultérieurement, elles régressent jusqu'à l'âge de six à sept ans (adrénarchie). Les concentrations diffèrent entre les deux sexes selon le stade pubertaire ; un peu plus élevées chez le sexe féminin. Les valeurs usuelles de la DHEA et DHEA-S sont indiquées dans les Tableaux 1 et 2 [26,33–35]. Les valeurs urinaires de la DHEA sont strictement corrélées aux variations plasmatiques. Jusqu'à l'âge de huit ans, elles ne dépassent pas $1,08 \pm 0,26 \mu\text{g/j}$. Entre dix et 18 ans, les valeurs augmentent progressivement pour atteindre à 18 ans $2,55 \pm 0,54 \mu\text{g/j}$ [28]. Toutefois, chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence en fonction de la technique et du protocole pré-analytique utilisé. Il faudra tenir compte de la variabilité intra- et inter-individuelle et des facteurs susceptibles d'influencer les concentrations plasmatiques des deux stéroïdes, telle que l'activité sportive d'endurance qui peut les augmenter [36].

Le facteur de conversion de la DHEA-S du $\mu\text{g/dL}$ en $\mu\text{mol/L}$ est de 0,02714 ; celui de la DHEA du ng/dL en nmol/L est de 0,0347.

Effets biologiques de la déhydroépiandrosterone

Le rôle physiologique de la DHEA n'est pas, à ce jour, clairement défini. Son action biologique la plus marquée résulte de sa conversion en stéroïdes sexuels. La formation des dérivés de la DHEA s'opère dans les tissus périphériques contenant les enzymes nécessaires. Les effets androgéniques qui peuvent être attribués à cette prohormone sont l'amélioration de la libido, de la fonction sexuelle et la procuration d'une sensation de bien-être psychique [5,37]. Les effets estrogéniques les plus remarquables sont l'augmentation de l'ostéosynthèse et la minéralisation osseuse [5].

Une étude menée par Welle et al. [38] a révélé que la DHEA n'a pas d'effet sur le métabolisme énergétique. Après évaluation du rendement d'incorporation de la leucine dans les protéines musculaires à forte concentration de DHEA, aucun effet n'a été attribué à cette prohormone sur le métabolisme protéique. Ces informations sont en contradiction avec celles rapportées par une autre étude [39].

La DHEA est active sur le métabolisme des lipides : elle réduit le pourcentage de matière grasse de l'organisme [39], suite probablement à la conversion de la DHEA et son aromatisation en estrogènes, indépendamment de l'E₁ et l'E₂ dont les concentrations plasmatiques restent inchangées [39] : d'où l'importance du phénomène d'intracrine introduit par Labrie [11]. Une supplémentation par la DHEA pendant 28 jours provoque une baisse de 7,5 % du taux de cholestérol, et plus exactement du LDL-cholestérol (effet estrogénique) [39]. À faible concentration, la DHEA joue un rôle protecteur contre la peroxydation lipidique ; cependant, à forte dose elle a un effet inverse [40].

Au niveau du métabolisme glucidique, la DHEA augmente la sensibilité des cellules à l'insuline et l'absorption cellulaire du glucose [41] par l'induction des protéines GLUT 1 et GLUT 4 [42]. Un effet antidiabétique lui est associé [41]. La diminution de la DHEA-S au cours de la vie est corrélée à une augmentation de l'intolérance au glucose. En synergie avec ces informations, il est fréquent de retrouver de faibles concentrations de la DHEA-S au cours du syndrome de résistance à l'insuline [43,44]. À une concentration de l'ordre de 10^{-5} M , la DHEA inhibe l'activité de la G6PD dans les gonades, le foie et à des concentrations élevées (50 à 100 fois), elle inhibe la prolifération des fibroblastes [45]. La même observation est rapportée pour les cellules de l'endothélium vasculaire [46]. Les effets sur la prolifération cellulaire semblent varier selon le type cellulaire concerné et les concentrations de la DHEA et ses dérivés (physiologiques ou pharmacologiques) [47].

Cette prohormone possède aussi un pouvoir anti-athérome, expliqué par des mécanismes tels que l'inhibition de l'expression des récepteurs CD40/CD40L, induite par l'IFN-gamma (interféron-gamma). Il a été démontré qu'une inhibition est exercée par la DHEA sur l'ERK1/2 induite par l'IFN-gamma [48]. Il est clairement établi que la DHEA possède un effet anti-glucocorticoïde [49] qui s'exerce via

Tableau 1 Valeurs usuelles plasmatiques de la déhydroépiandrostérone (DHEA) en fonction de l'âge et du sexe.

Âge (ans)	Masculin (nmol/L)	Féminin (nmol/L)	Méthode de dosage	
0–5	4,59 ± 3,96	5,95 ± 5,12	RIA (immunotech) [26]	
6–10	3,97 ± 3,01	5,58 ± 5,29		
11–15	10,20 ± 7,02	16,70 ± 9,76		
16–20	29,70 ± 16,70	38,30 ± 20,20		
21–25	23,20 ± 12,90	31,60 ± 13,40		
26–30	20,90 ± 6,06	23,90 ± 21,00		
31–35	26,70 ± 13,40	20,20 ± 11,10		
36–40	16,80 ± 6,93	31,50 ± 17,90		
41–45	14,00 ± 6,59	29,50 ± 20,40		
46–50	15,90 ± 10,70	26,80 ± 14,00		
51–60	11,00 ± 4,28	23,40 ± 16,10		
> 60	6,14 ± 3,51	12,30 ± 9,04		
Masculin		Féminin		
Âge par ans (stade pubertaire)	Valeurs usuelles (nmol/L)	Âge (stade pubertaire)	Valeurs usuelles (nmol/L)	Méthode de dosage
< 9,8 (P1)	1–12	< 9,2 (P1)	1–12	Information indisponible [33]
9,8–14,5 (P2)	4–17	9,2–13,7	5–20	
10,7–15,4 (P3)	6–20	10,0–14,4	7–21	
11,8–16,2 (P4)	6–22	10,7–15,6	7–27	
12,8–17,3 (P5)	9–32	11,8–18,6	7–30	

un mécanisme non génomique et que l'altération de sa concentration avec l'âge, contrairement au cortisol (diminution du rapport DHEA/cortisol), développe un terrain favorable aux effets délétères de ce glucocorticoïde. Le terme « neurostéroïde » a été introduit pour désigner les hormones produites au niveau du système nerveux et plus particulièrement le cerveau. La DHEA est l'un des neurostéroïdes produits localement, tout comme la progestérone, capable d'exercer une fonction modulatrice du système nerveux central [50].

La 7 α -OH-DHEA est un dérivé hydroxylé de la DHEA et l'un de ces médiateurs pour la stimulation de la réponse immunitaire [51]. La 16 α -OH-DHEA n'a pas de fonction connue, mais il a été rapporté que sa concentration urinaire s'élève chez les patients hypertendus [52].

Les données permettant de conclure à l'existence d'un récepteur pour la DHEA (et/ou ses métabolites) au niveau de la membrane cellulaire s'accumulent de jour en jour, sans pour autant qu'un des récepteurs de forte affinité à la DHEA ou à l'un de ses dérivés fut isolé [53]. À ce jour, on sait que des récepteurs tels que le Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha (PPAR α) sont activés, mais le mécanisme précis de prolifération des peroxysomes induit par la DHEA reste actuellement inconnu. De même pour le Pregnane X Receptor (PXR) et Estrogen Receptor (ER) les mécanismes d'activation demeurent inconnus [4].

Variations pathologiques de la déhydroépiandrostérone et indications de dosage

La concentration de DHEA et de son dérivé sulfaté peut varier selon la situation physiopathologique.

Augmentation de la déhydroépiandrostérone et de son sulfate

Les étiologies sont nombreuses : blocage enzymatique, tumeurs virilisantes de la surrénale, syndrome des ovaires polykystiques.

Les concentrations plasmatiques de la DHEA et du sulfate de DHEA apportent des informations sur la sécrétion androgénique d'origine surrénalienne. En pratique, leur dosage est particulièrement utile pour la mise en évidence d'une tumeur surrénalienne. Dans les corticosurrénalomes malins, des concentrations élevées sont retrouvées. Le taux de la DHEA-S permet d'orienter le diagnostic différentiel vers une forme bénigne ou maligne [54]. D'autres études contredisent cette indication [55].

Des taux plus modérés (voir limite de la normale) de la DHEA et de son sulfate sont observés chez les hétérozygotes pour la 21-hydroxylase. Des valeurs supra-physiologiques de la DHEA-S sont observées dans 50% des cas de déficit en la 21-hydroxylase (forme non classique) [56]. Le déficit complet en la 3 β -HSD entraîne un effondrement des taux plasmatiques du cortisol, de l'aldostérone et des androgènes surrénaliens (DHEA). Le diagnostic est possible dès la limite inférieure de deux écarts-types de la valeur de référence. Le test de stimulation au synacthène est très informatif à ce niveau : une élévation importante est obtenue au bout d'une heure. Une valeur supérieure à 58,22 nmol/L qui est la valeur usuelle au bout de 60 minutes [57] est l'un des critères de diagnostic du déficit en la 3 β -HSD. Mais chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs. Le dosage de la DHEA sur un seul prélèvement peut être informatif dans la mesure où la valeur est très élevée. La DHEA-S n'est pas stimuable par le synacthène. L'élévation du rapport

Tableau 2 Valeurs usuelles sériques de la DHEA-S en fonction de l'âge et du sexe ([34,35]).

	Masculin ($\mu\text{mol/L}$)	Féminin ($\mu\text{mol/L}$)	Méthode de dosage
<i>Cordon ombilical, entre 18–34 semaines de gestation</i>	3,06–4,11		RIA
26–28 semaines, 4 ^e jour	3,33–23,93		LC-MS
31–35 semaines, 4 ^e jour	3,31–19,26		
<i>Âge</i>			
3 j	2,38–9,66		LC-MS
1 mois	< 3,03		
6 mois	< 1,32		
1–5 ans	< 1,54		
6–7 ans	< 1,95		
8–10 ans	< 5,23		
<i>Âge (stade pubertaire) – Masculin ($\mu\text{mol/L}$)</i>			
< 9,8 ans (P1)	0,35–2,25		
9,8–14,5 ans (P2)	1,13–2,95		
10,7–15,4 ans (P3)	1,3–5,42		
11,8–16,2 ans (P4)	2,76–10,44		
12,8–17,3 ans (P5)	3,25–10,04		
<i>Âge (stade pubertaire) – Féminin ($\mu\text{mol/L}$)</i>			
< 9,2 ans (P1)	0,51–3,90		
9,2–13,7 ans (P2)	0,92–3,50		
10,0–13,7 ans (P3)	0,86–6,13		
10,7–15,6 ans (P4)	1,57–7,05		
11,8–18,6 ans (P5)	1,19–6,73		
<i>Âge (ans)</i>			
21–30	1,03–14,19	0,59–10,09	
31–40	0,89–11,2	0,46–7,76	
41–50	0,43–10,58	< 6,21	
51–60	< 8,08	< 5,83	
61–70	< 6,81	< 3,47	
71–80	< 5,64	< 3,01	
81–90	< 2,87	< 2,74	

DHEA/androsténédione peut être informative pour orienter le diagnostic vers une hyperandrogénie par déficit en 3β -HSD [57].

Au cours du syndrome des ovaires polykystiques, il y a une élévation des métabolites de la DHEA : DHEA-S, la 11-OH-androsténédione.

Lors de l'adrénarchie précoce et de l'hyperprolactinémie, une élévation modérée de la DHEA est notée [58].

Au cours du consensus de 2010 [59], la Société française d'endocrinologie a élaboré un arbre décisionnel pour l'exploration de l'hyperandrogénie féminine. Les recommandations préconisent un dosage de la testostérone (T) comme paramètre de première intention.

Tableau 3 Substances affectant la concentration de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de la DHEA-S [70].

Substances qui élèvent la concentration de la DHEA	Substances qui diminuent la concentration de la DHEA	Substances qui élèvent la concentration de la DHEA-S	Substances qui diminuent la concentration de la DHEA-S
HCG ACTH Prolactine Benfluorex Clomiphène Alprazolam	Dexaméthasone Insuline	HCG ACTH Benfluorex Metformine Prolactine Agents neuroleptiques	Régime pauvre en graisse Dexaméthasone Insuline Clomipramine Vitamine E Consommation d'alcool (éthanol)
Agents neuroleptiques Nicotine		Nitrendipine Nicotine Retinol	

Tableau 4 Anticorps pour le dosage de la déhydroépiandrostérone (DHEA), de ses métabolites et les taux de réactions croisées respectifs.

Molécule cible	DHEA [71]	DHEA-S [72]	7 α -OH-DHEA [73]	7 β -OH-DHEA [74]	16 α -OH-DHEA [75]
Type d'anticorps	—	DHEA-3HS-BSA (8B11) (%)	7 α -OH-DHEA-19-CMO-BSA (%)	7 β -OH-DHEA-19-CMO-BSA (%)	16 α -OH-DHEA-19-CMO-BSA (%)
DHEA-S	0,05	100	—	—	< 0,01
DHEA	100 %	20	1,95	0,82	< 0,01
Sulfate d'androstérone	—	14	—	—	—
Sulfate d'épiandrostérone	—	9	—	—	—
Epiandrostérone	4,55	—	—	—	—
Androstérone	0,248	11	—	—	—
Androstérone glucuronidée	—	19	—	—	—
Androstènedione	0,61	0,8	—	Insignifiante	—
Etiocholanolone	—	< 0,01	—	—	—
Testostérone	0,496	< 0,01	—	Insignifiante	< 0,01
5 α -androstène-3 α ,17 β -diol	—	< 0,1	—	Insignifiante	< 0,01
Cortisol	0,124	< 0,01	—	—	—
Progestérone	0,419	< 0,01	—	—	< 0,01
Estradiol	0,196	< 0,01	—	—	—
Sulfate d'estrone	—	< 0,01	—	—	—
Estrone	0,173	—	—	—	—
5-androstène-3 β -7 α -17 β -triol	—	—	0,49	Insignifiante	—
7-oxo-DHEA	—	—	0,16	0,07	—
Dihydrotestostérone	0,471	—	0,04	Insignifiante	—
Prégnénolone	—	—	0,04	Insignifiante	—
7-oxo-prégnénolone	—	—	0,02	0,08	—
7 β -OH-DHEA	—	—	1,16	100	—
7 α -OH-DHEA	—	—	100	0,15	—
Estriol	—	—	—	—	< 0,01
4-androstène-3,17-dione	—	—	—	—	< 0,01
16 β -OH-DHEA	—	—	—	—	0,13
16 α -OH-DHEA	—	—	—	—	100

Si la valeur de la T est supérieure à 200 ng/dL, il est recommandé de pratiquer le dosage de la DHEA-S :

- pour une concentration supérieure à 600 µg/dL, le diagnostic est orienté vers un corticosurrénalome sécrétant des androgènes ;
- pour une concentration normale, le diagnostic est orienté vers une tumeur ovarienne sécrétant des androgènes.

Le dosage de la testostérone par technique immunologique doit être précédé d'une extraction par un solvant organique : des problèmes de réactions croisées avec la DHEA-S ont été rapportés avec la plupart des kits.

Diminution de la déhydroépiandrostérone et de son sulfate

Les concentrations de la DHEA ou de la DHEA-S sont basses en cas d'insuffisance surrénale primaire ou secondaire. Chez les patients atteints d'un syndrome de Cushing dû à un adénome surrénalien, il y a une déplétion de la DHEA-S plasmatique [60]. Des valeurs normales peuvent être observées dans la maladie de Cushing [60]. Une diminution lors d'un déficit en 21-hydroxylase avec perte de sel.

Un abaissement de la DHEA-S et du rapport DHEA-S/DHEA est observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de démence [61].

Une altération des taux plasmatiques de la DHEA-S est corrélée avec plusieurs autres pathologies (maladies cardiovasculaires, cancer de la prostate, lupus érythémateux).

Il faut tenir compte de l'âge des patients et des données cliniques pour interpréter les résultats.

Phase préanalytique

Au niveau sanguin

Il n'y pas de précautions particulières pour la pratique des dosages sur plasma ou sur sérum. Toutefois, il est recommandé pour certains kits ou automates (immulite 2000, Nichols Advantage) d'utiliser le sérum [62]. Certains tubes collecteurs (en plastique : Greiner Bio-One™ Vacuette™ et plastic BD Vacutainer SST™ tubes ; en verre : glass Becton Dickinson [BD] Vacutainer™) disponibles sur le marché pour le prélèvement ne semblent pas altérer la concentration de la DHEA-S [63].

La sécrétion de la DHEA suit le nyctémère, il est donc préférable de standardiser l'heure de prélèvement entre huit et dix heures du matin.

Le dosage de la DHEA-S ne nécessite aucune extraction préalable car sa concentration est très élevée et le risque de réaction croisée est faible. En revanche, la quantification de la DHEA nécessite une étape d'extraction par l'éther éthylique [62]. Fiet et al. [57] ont réalisé une purification par chromatographie sur célite (95:5 ; iso-octane : dichlorométhane). La purification sur la colonne Sephadex LH20 est possible avec une mixture hexane ; benzène ; méthanol (90:5:5). La DHEA-S est stable un jour, à température ambiante, deux semaines entre 4–8 °C et plus d'un

an à –20 °C [64]. La DHEA est stable quelques jours entre 4–8 °C, mais elle est très stable à –20 °C.

Au niveau salivaire

Le recueil de la salive pour le dosage de la DHEA et de son sulfate peut être effectué de manière passive ou avec des salivettes à base de coton. Certaines études [65] rapportent une interférence possible du coton sur ces analytes. Il est préférable d'éviter les stimulants gustatifs tels que l'acide citrique. Au cas où leurs utilisations s'imposent (service de gériatrie), une validation de la technique est requise. Les échantillons devront être centrifugés à 1500 g (au moins) pendant cinq minutes pour l'élimination de la mucine [66]. La contamination par le sang (microsaignements) est rare et affecte peu les concentrations salivaires de la DHEA [67]. La contamination des prélèvements par les bactéries n'altère pas les taux de la DHEA [68]. L'extraction de la DHEA peut être faite par l'acétate d'éthyle : hexane (3:2).

La DHEA est stable au bout de trois cycles de congélation/décongélation et peut être conservée jusqu'à au moins six mois à –20 °C [69].

Au niveau urinaire

La DHEA urinaire (appartient aux 17-cétostéroïdes) prise isolément est un paramètre qui ne présente pas d'intérêt particulier. Elle peut être quantifiée parmi d'autres paramètres au cours de l'établissement du « profilage » lors de l'exploration fonctionnelle. La vérification de la qualité du prélèvement nécessite le dosage de la créatinine urinaire. Il est possible d'ajouter de l'azide de sodium pour la conservation. Ce conservateur est un inhibiteur de la peroxydase et donc il est déconseillé pour les techniques d'immunoanalyse utilisant cet enzyme.

Xénobiotiques et hormones susceptibles d'influencer les concentrations de la déhydroépiandrostérone et de son sulfate

Différents médicaments et hormones sont susceptibles d'influencer le taux circulant de la DHEA et de son sulfate. La communication entre le clinicien et le biologiste est importante à ce niveau, pour la mise en évidence des troubles iatrogènes et de les différencier des troubles pathologiques. Le [Tableau 3](#) présente une liste non exhaustive de ces substances. Toutefois, les données restent variables en fonction de la durée du traitement par le médicament, selon l'âge ou l'index de masse corporelle.

Techniques d'immunoanalyse et molécules de la réaction croisée

Les techniques employant la spectrométrie de masse sont plus robustes pour la quantification de la DHEA et nécessitant moins de prétraitement pour les échantillons. Les différents anticorps utilisés pour la quantification de la DHEA et ses métabolites ainsi que les taux de croisement (de certains kits) sont consignés dans le [Tableau 4](#) [71–75]. Le plus souvent, il s'agit d'un dosage compétitif utilisant des

marqueurs tels que l'iode ¹²⁵I, le tritium, HRP (peroxydase de Raifort) et la peroxydase. Le complexe immunogène utilisé pour l'immunisation des animaux afin d'obtenir des anticorps dirigés contre la DHEA est le DHEA-17-CMO-BSA [76]. Récemment, une étude menée par Shrivastav et al. [76] révèle que, pour une technique de type Enzyme Immunoassay (EIA), l'introduction dans la molécule du conjugué (entre le stéroïde et l'enzyme) d'un pont de type éthylène diamine, urée ou dihydrazide d'acide adipique (diacide carboxylique aliphatique de formule brute C₆H₁₀O₄), augmente la sensibilité de la technique et réduit le taux de réaction croisée. La nature hydrophile ou hydrophobe de ce pont ou «spacer» est très importante pour la spécificité et la sensibilité analytique.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Strott CA. Steroid sulfotransferases. *Endocr Rev* 1996;17: 670–97.
- [2] Comer KA, Falany JL, Falany CN. Cloning and expression of human liver dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Biochem J* 1993;289:233–40.
- [3] El Kihel L. Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA)—Recent reports. *Steroids* 2012;77:10–26.
- [4] Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael Miller KK. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev* 2006;38:89–116.
- [5] Oudet B, Rigabert J, Young J, Raffin-Sanson ML. Physiologie et exploration des sécrétions de cortisol et d'androgènes par la surrénale. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition (2010), 10-014-B-10.</O.
- [6] Provost P, Lavallée B, Bélanger A. Transfer of dehydroepiandrosterone- and pregnenolone-fatty acid esters between human lipoproteins. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:182–7.
- [7] Lavallée B, Provost PR, Roy R, Gauthier MC, Bélanger A. Dehydroepiandrosterone-fatty acid esters in human plasma: formation, transport and delivery to steroid target tissues. *J Endocrinol* 1996;150(Suppl.):S119–24.
- [8] Kullak-Ublick GA, Fisch T, Oswald M, Hagenbuch B, Meier PJ, Beuers U, et al. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. *FEBS Lett* 1998;424:173–6.
- [9] Knapstein P, David A, Wu CH, Archer DF, Flickinger GL, Tochtone JC. Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids* 1968;11:885–96.
- [10] Ebeling P, Koivisto VA. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 1994;343:1479–81.
- [11] Labrie F. Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:C113–8.
- [12] Seron-Ferré M, Lawrence CC, Siiteri PK, Jaffe RB. Steroid production by definitive and fetal zones of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:603–9.
- [13] Mesiano S, Coulter CL, Jaffe RB. Localization of cytochrome P450cholesterol side chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20lyase, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: a reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1184–9.
- [14] Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2916–20.
- [15] Muller C, Pompon D, Urban P, Morfin R. Inter-conversion of 7 α - and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;99:215–22.
- [16] Reis FM, D'Antona D, Petraglia F. Predictive value of hormone measurements in maternal and fetal complications of pregnancy. *Endocr Rev* 2002;23:230–57.
- [17] Kroboth PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF. DHEA and DHEA-S: a review. *J Clin Pharmacol* 1999;39:327–48.
- [18] Pavlov EP, Harman SM, Chrousos GP, Loriaux DL, Blackman MR. Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:767–72.
- [19] Pöth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2343–9.
- [20] González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell Tissue Res* 1994;278:201–5.
- [21] Jian M, Parker Jr CR. Macrophage migration inhibitory factor is a constitutively expressed cytokine in the human adrenal gland. *IUBMB Life* 2003;55:155–8.
- [22] Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 1998;19:101–43.
- [23] Straub RH, Zeuner M, Lock G, Schölmerich J, Lang B. High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1997;36:426–32.
- [24] Isidori AM, Kaltsas GA, Perry L, Burrin JM, Besser GM, Monson JP. The effect of growth hormone replacement therapy on adrenal androgen secretion in adult onset hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58:601–11.
- [25] de Peretti E, Forest MG. Unconjugated dehydroepiandrosterone plasma levels in normal subjects from birth to adolescence in human: the use of a sensitive radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;43:982–91.
- [26] Sulcová J, Hill M, Hampl R, Stárka L. Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J Endocrinol* 1997;154:57–62.
- [27] Miller WL. Androgen synthesis in adrenarche. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10:3–17.
- [28] Remer T, Boye KR, Hartmann MF, Wudy SA. Urinary markers of adrenarche: reference values in healthy subjects, aged 3–18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2015–21.
- [29] Gell JS, Carr BR, Sasano H, Atkins B, Margraf L, Mason JI, et al. Adrenarche results from development of a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficient adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3695–701.
- [30] Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2396–402.
- [31] Peter M, Dörr HG, Sippell WG. Changes in the concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate and estriol in maternal plasma during pregnancy: a longitudinal study in healthy women throughout gestation and at term. *Horm Res* 1994;42:278–81.
- [32] Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, Christensen JM. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A(1c), IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. *Clin Chem* 2000;46:551–9.

- [33] Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC. Pediatric reference ranges. 4^e éd. Washington, USA: AACC Press; 2003, p. 73–4.
- [34] Endocrinology expected values. Esoterix endocrinology, Calabasas Hills, California: Esoterix 2011;2:1–2. <http://www.esoterix.com>.
- [35] Parker Jr CR, Leveno K, Carr BR, Hauth J, MacDonald PC. Umbilical cord plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate during human gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;54:1216–20.
- [36] Tissandier O, Péres G, Fiet J, Piette F. Testosterone, dehydroepiandrosterone, insulin-like growth factor 1, and insulin in sedentary and physically trained aged men. *Eur J Appl Physiol* 2001;85:177–84.
- [37] Brooke AM, Kaling LA, Miraki-Moud F, Camacho-Hübner C, Maher KT, Walker DM, et al. Dehydroepiandrosterone improves psychological well-being in male and female hypopituitary patients on maintenance growth hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3773–9.
- [38] Welle S, Jozefowicz R, Statt M. Failure of dehydroepiandrosterone to influence energy and protein metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1259–65.
- [39] Nestler JE, Barlascini CO, Clore JN, Blakard WG. Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:57–61.
- [40] Gallo M, Aragnol M, Gatto V, Tamagno E, Brignardello E, Manti R, et al. Protective effect of dehydroepiandrosterone against lipid peroxidation in a human liver cell line. *Eur J Endocrinol* 1999;141:35–9.
- [41] Nakashima N, Haji M, Sakai Y, Ono Y, Umeda F, Nawata H. Effect of dehydroepiandrosterone on glucose uptake in cultured human fibroblasts. *Metabolism* 1995;44:543–8.
- [42] Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Belsanti G, Montrone C, Cignarelli A, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates glucose uptake in human and murine adipocytes by inducing GLUT1 and GLUT4 translocation to the plasma membrane. *Diabetes* 2004;53:41–52.
- [43] Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:551–555.
- [44] Słowińska-Srzednicka J, Malczewska B, Srzednicki M, Chotkowska E, Brzezińska A, Zgliczyński W, et al. Hyperinsulinaemia and decreased plasma levels of dehydroepiandrosterone sulfate in premenopausal women with coronary heart disease. *J Intern Med* 1995;237:465–72.
- [45] Saenger P, New M. Inhibitory action of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fibroblast growth. *Experientia* 1977;33:966–7.
- [46] Hinson JP, Khan M. Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) inhibits growth of human vascular endothelial cells. *Endocr Res* 2004;30:667–71.
- [47] Chung KF, Qin N, Androutsellis-Theotokis A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation and differentiation of chromaffin progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol* 2011;336:141–8.
- [48] Li Y, Xia Z, Wang M. Dehydroepiandrosterone inhibits CD40/CD40L expression on human umbilical vein endothelial cells induced by interferon gamma. *Int Immunopharmacol* 2009;9:168–72.
- [49] Kalimi M, Shafagaj Y, Loria R, Padgett D, Regelson W. Anti-glucocorticoid effects of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Mol Cell Biochem* 1994;131:99–104.
- [50] Schumacher M, Akwa Y, Guennoun R, Robert F, Robel P, Baulieu EE. Neurostéroïdes : progrès récents. *Med Ther Endocrinol Reprod* 2001;3:74–84.
- [51] Morfin R, Lafaye P, Cottillon AC, Nato F, Chmielewski V, Pompon D. 7 alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:971–82.
- [52] Hampl R, Starka L. Minireview: 16alpha-hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance. *Endocr Regul* 2000;34:161–3.
- [53] Widstrom RL, Dillon JS. Is there a receptor for dehydroepiandrosterone or dehydroepiandrosterone sulfate? *Semin Reprod Med* 2004;22:289–98.
- [54] Terzolo M, Ali A, Osella G, Reimondo G, Pia A, Peretti P, et al. The value of dehydroepiandrosterone sulfate measurement in the differentiation between benign and malignant adrenal masses. *Eur J Endocrinol* 2000;142:611–7.
- [55] Bencsik Z, Szabolcs I, Kovacs Z, Ferencz A, Voros A, Kaszas I, et al. Low dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) level is not a good predictor of hormonal activity in nonselected patients with incidentally detected adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1726–9.
- [56] Huerta R, Dewailly D, Decanter C, Knochenhauer ES, Boots LR, Azziz R. 11-Beta-hydroxyandrostenedione and delta 5-androstenediol as markers of adrenal androgen production in patients with 21-hydroxylase-deficient non classic adrenal hyperplasia. *Fertil Steril* 1999;72:996–1000.
- [57] Fiet J, Gosling JP, Soliman H, Galons H, Boudou P, Aubin P, et al. Hirsutism and acne in women: coordinated radioimmunoassay for eight relevant plasma steroids. *Clin Chem* 1994;40:2296–305.
- [58] Guéchet J. Déhydroépiandrostérone (DHEA) et sulfate de DHEA. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Biologie clinique (2003), 90-10-0380.
- [59] Pugeat M, Déchaud H, Raverot V, Denuzière A, Cohen R, Boudou P. Recommandations pour l'exploration des hyperandrogénies. *Ann Endocrinol* 2010;71:e3–8.
- [60] Flecchia D, Mazza E, Carlini M, Blatto A, Olivier F, Serra A, et al. Reduced serum levels of dehydroepiandrosterone sulphate in adrenal incidentalomas: a marker of adrenocortical tumour. *Clin Endocrinol* 1995;42:129–34.
- [61] Yanase T, Fukahori M, Taniguchi S, Nishi Y, Sakai Y, Takayanagi R, et al. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEA-S) in Alzheimer's disease and in cerebrovascular dementia. *Endocr J* 1996;43:119–23.
- [62] Nonnenmacher L. Informations réactifs : DHEA, DHEA-sulfate, 17 α -OH progestérone. *Immunoanal Bio Spec* 2002;17:348–55.
- [63] Bowen RAR, Chan Y, Cohen J, Rehak NN, Hortin GL, Csako G, et al. Effect of blood collection tubes on total triiodothyronine and other laboratory assays. *Clin Chem* 2005;51:424–33.
- [64] Narayanan S. Stability considerations in tumor marker measurements. *Indian J Clin Biochem* 1996;11:120–3.
- [65] Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26:165–73.
- [66] Whetzel CA, Klein LC. Measuring DHEA-S in saliva: time of day differences and positive correlations between two different types of collection methods. *BMC Res Notes* 2010;3:204.
- [67] Granger DA, Cicchetti D, Rogosch FA, Hibell LC, Teisl M, Flores E. Blood contamination in children's saliva: prevalence, stability, and impact on the measurement of salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology* 2007;32:724–33.
- [68] Whemolua GL, Granger DA, Singer S, Kivlighan KT, Marguin JA. Bacteria in the oral mucosa and its effects on the measurement of cortisol, dehydroepiandrosterone, and testosterone in saliva. *Horm Behav* 2006;49:478–83.
- [69] Higashi T, Shibayama Y, Shimada K. Determination of salivary dehydroepiandrosterone using liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with charged derivatization. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;846:195–201.

- [70] Salek FS, Bigos KL, Kroboth PD. The influence of hormones and pharmaceutical agents on DHEA and DHEA-S concentrations: a review of clinical studies. *J Clin Pharmacol* 2002;42:247–66.
- [71] DHEA. Louvain la Neuve, Belgique : DIAsource. [Fiche technique] <http://www.diasource-diagnostics.com>.
- [72] Lewis JG, Bason LM, Elder PA. Production and characterization of monoclonal antibodies to dehydroepiandrosterone sulfate: application to direct enzyme-linked immunosorbent assays of dehydroepiandrosterone sulfate and androsterone/epiandrosterone sulfates in plasma. *Steroids* 1996;61:682–7.
- [73] Lapčík O, Hampl R, Hill M, Stárka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids: 2. Radioimmunoassay of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;71:231–7.
- [74] Lapčík O, Hampl R, Hill M, Bicíková M, Stárka L. Immunoassay of 7-hydroxysteroids: 1. Radioimmunoassay of 7 β -hydroxy dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;67:439–45.
- [75] Zamrazilová L, Kazihnitková H, Lapčík O, Hill M, Hampl R. A novel radioimmunoassay of 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and its physiological levels. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:130–5.
- [76] Shrivastav TG, Chaube SK, Kariya KP, Singh R, Kumar D, Pandit D, et al. Influence of different lenght linker containing DHEA-7-CMO-Enzyme conjugates on sensitivity and specificity of DHEA-17-CMO-Antibody. *J Immunoassay Immunochem* 2011;32:269–83.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immunoanalytiques des vitamines D (formes 25(OH)D et 1,25(OH)₂D)

Immunoanalytical characteristics of vitamin D (25(OH)D and 1,25(OH)₂D)

O. Gaillard*, C. Desbène

Laboratoire de biochimie, pôle biologie pathologie, centre hospitalier Le Mans, 194, avenue Rubillard, 72037 Le Mans cedex 09, France

Reçu le 25 juillet 2012 ; accepté le 18 septembre 2012

KEYWORDS

Vitamin D;
25-hydroxyvitamin D
(OH);
1,25-
dihydroxyvitamin D
1,25 (OH)₂

MOTS CLÉS

Vitamine D ;
25(OH)D ;
1,25(OH)₂D

Summary Besides structural and physiological vitamin D data, this paper points out the optimal conditions for sampling, assays and interpretation of results.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Après les caractéristiques structurales et physiologiques de la vitamine D, les données pré-, per- et postanalytiques de son dosage sont abordées pour l'interprétation des résultats.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Structure

La vitamine D a une structure moléculaire de stéroïde. Elle existe sous différentes formes différant entre elles par leur degré d'hydroxylation (Fig. 1) [1].

Biosynthèse

La vitamine D a deux origines, exogène et endogène. L'origine exogène est représentée par les sources

alimentaires (dont la consommation reste toutefois limitée) soit animales essentiellement représentées par les poissons gras (vitamine D3 ou cholécalciférol = D3), soit végétales (vitamine D2 ou ergocalciférol = D2) [1]. Ces vitamines D2 et D3 sont absorbées dans l'intestin grêle [2,3]. La seconde origine qui représente en règle générale la majeure partie est endogène sous la forme de vitamine D3. La peau peut la synthétiser à partir de 7-déhydrocholestérol sous l'effet de certains rayonnements UVB (longueur d'onde entre 290 et 315 nm) [4]. Sous l'influence de la température (optimale à 37°C), cette prévitamine D3 est ensuite isomérisée en vitamine D3. En situation d'exposition intense à un ensoleillement important, l'excès de prévitamine D3 formé est transformé en composé inactif sous l'effet de la chaleur ;

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : ogaillard@ch-lemans.fr (O. Gaillard).

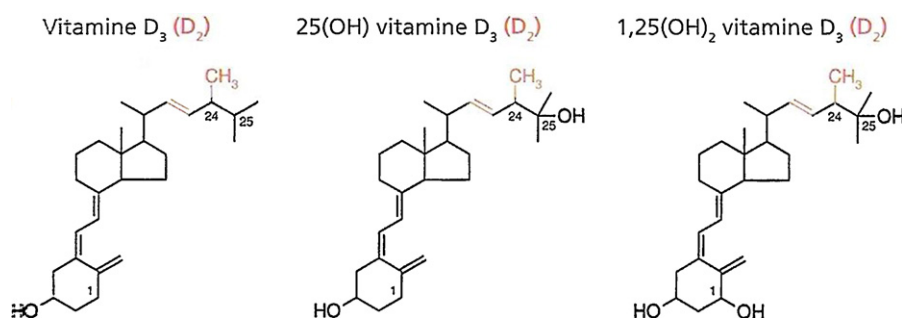


Figure 1 Différences structurales entre vitamine D3 et D2 et leurs métabolites.

il n'y a pas d'intoxication à la vitamine D suite à une exposition excessive et prolongée au soleil [1].

Il est important de noter que la présence des UVB dépend de l'angle entre le soleil et la surface de la Terre, donc de la latitude mais aussi de l'altitude. S'ils sont présents toute l'année en zone intertropicale, cela n'est plus vrai lorsqu'on s'éloigne significativement de l'équateur. Pour les latitudes de 45–50 degrés (c'est le cas de la France), les UVB ne sont présents que cinq à six mois dans l'année (de début avril à fin septembre) et seulement lors des heures « chaudes » pour les extrémités de ces périodes. Une exposition à un « soleil d'hiver » ne permet donc pas de synthétiser de la vitamine D3, sauf en altitude. En revanche, si les UVB sont présents, la synthèse cutanée de vitamine D3 sera équivalente au niveau de l'équateur et sous nos latitudes.

De nombreux facteurs interviennent dans cette synthèse : environnementaux (pollution atmosphérique, couverture nuageuse) et individuels (couleur de la peau, diminution avec l'âge des réserves cutanées en 7-déhydrocholestérol), protections vestimentaires [1].

Absorption, transport et métabolisme de la vitamine D

Qu'elle provienne de l'alimentation ou d'une supplémentation médicamenteuse, la vitamine D liposoluble est absorbée dans tout l'intestin grêle, associée à des sels biliaires et des acides gras libres.

L'intestin peut également absorber des métabolites de la vitamine D, comme la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) ou la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D). Toute maladie comportant une malabsorption ainsi que les régimes et médicaments empêchant l'absorption des graisses risquent d'avoir un impact négatif sur l'absorption intestinale de la vitamine D. Une partie de la vitamine D synthétisée ou ingérée va être stockée dans le tissu adipeux et cela d'autant plus que la masse grasse est importante.

La vitamine D et ses métabolites sont des stéroïdes et sont donc liposolubles/hydrophobes. Ils doivent par conséquent être transportés par des protéines dans les milieux aqueux comme le plasma. Quelle que soit son origine, la vitamine D (D2 ou D3) est transportée dans le sang par une protéine porteuse de 458 acides aminés (PM = 52 kDa), la *vitamin D binding protein* (DBP) qui, outre ce rôle, augmente la demi-vie et module la distribution des métabolites de la vitamine D aux tissus.

Dans le foie, la vitamine D est hydroxylée sur le carbone 25 sous l'action d'une vitamine D-25-hydroxylase pour former la 25(OH)D ou calcidiol. Cette hydroxylation n'est pas (ou peu) régulée ; cela veut dire que plus la quantité de vitamine D synthétisée ou ingérée est importante, plus la quantité de 25(OH)D formée est grande [5].

La 25(OH)D est ensuite relarguée dans la circulation avec une demi-vie de deux à trois semaines.

Dans le rein, grâce à une enzyme, la 1- α -hydroxylase, la 25(OH)D est hydroxylée sur le carbone 1 pour former la 1,25 dihydroxy vitamine D (1,25(OH)₂D) ou calcitriol. Cette hydroxylation rénale est régulée et stimulée principalement par la parathormone (PTH), par une hypophosphatémie ou de faibles apports alimentaires en calcium ou en phosphate et par l'IGF1. Elle est inhibée par une hyperphosphatémie et la 1,25(OH)₂D elle-même [2].

La 1,25(OH)₂D est le métabolite actif de la vitamine D et sa demi-vie dans le sérum est de quatre heures environ (Fig. 2) [1].

Actions physiologiques

La 1,25(OH)₂D agit via un récepteur, le VDR (récepteur de la vitamine D), présent dans de nombreux tissus pour exercer un effet soit endocrine où elle agit directement sur les tissus cibles, soit autocrine par sa synthèse dans les cellules mêmes du tissu via l'hydroxylation de la 25(OH)D [2].

Le complexe VDR-1,25(OH)₂D, après s'être associé au récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) dans la cellule, va induire, à travers l'activation de sites appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), la synthèse de différentes protéines [2,6].

La 1,25(OH)₂D joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique avec une régulation des taux sériques de calcium physiologiques en agissant à la fois sur les parathyroïdes, le rein et l'intestin. Dans la cellule intestinale, la 1,25(OH)₂D permet, par un processus actif, d'augmenter l'absorption de calcium et de phosphate lorsque les apports calciques ou phosphorés sont faibles, ou dans certaines circonstances physiologiques (croissance, grossesse, lactation) ou pathologiques (hyperparathyroïdes, granulomatoses...).

Ainsi, les échanges phosphocalciques dans le tissu osseux permettent une minéralisation osseuse satisfaisante.

En cas de déficit en vitamine D, la diminution de l'absorption intestinale de calcium et la tendance à l'hypocalcémie vont induire une augmentation de la PTH

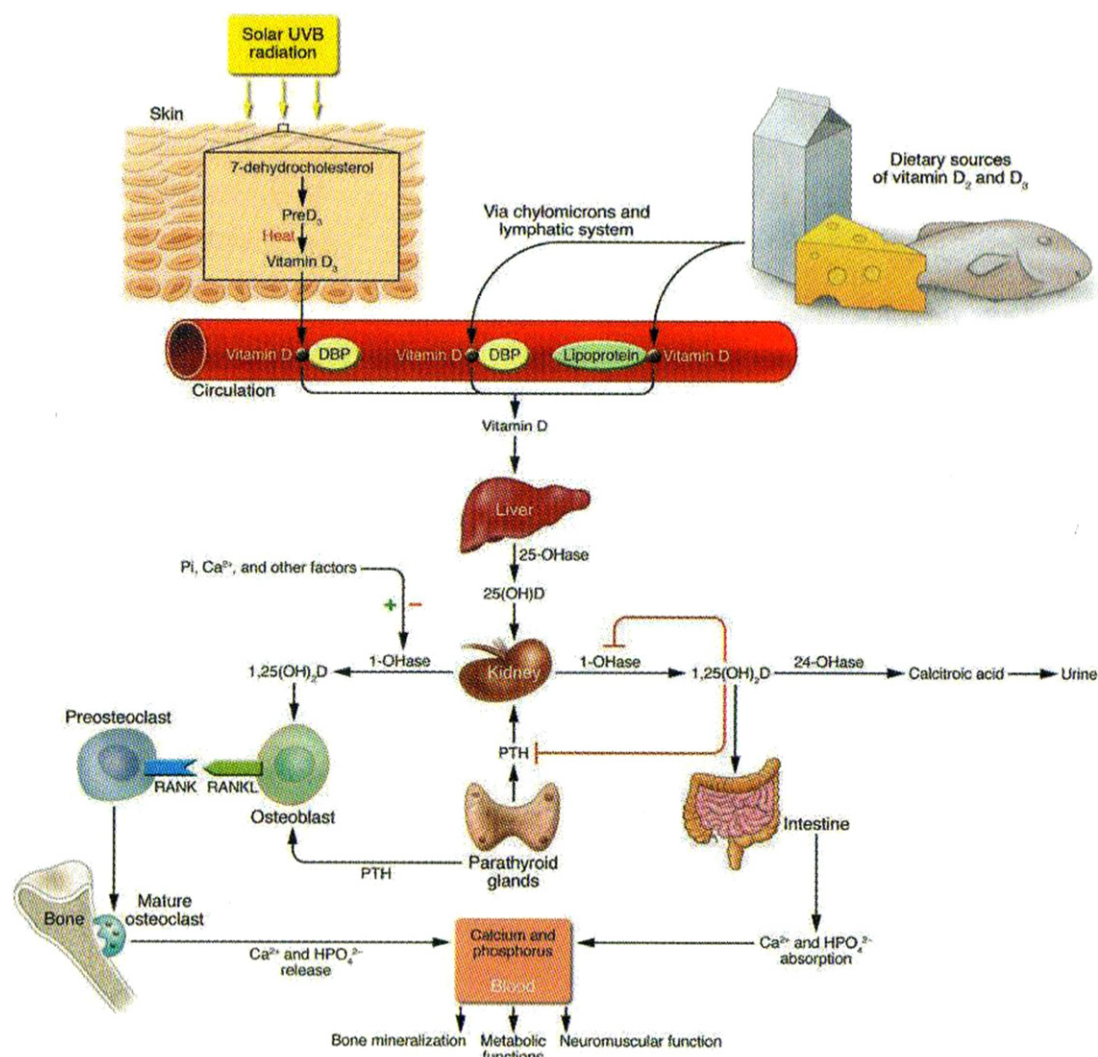


Figure 2 Métabolisme de la vitamine D.
D'après Souberbielle [1].

sérique qui va rétablir une calcémie normale mais aux dépens de l'os en stimulant le remodelage osseux (hyperparathyroïde secondaire) aboutissant à terme à une fragilité de l'os [3]. Si le déficit est profond, cela se traduit par un défaut de minéralisation représenté par le rachitisme chez l'enfant et par l'ostéomalacie chez l'adulte. Dans l'os, au niveau des ostéoblastes via le récepteur VDR, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tout comme la PTH et les prostaglandines, stimule la production d'une cytokine, le RANKL (ligand du *receptor activator of NF-Kappa B*), dont le rôle est essentiel dans la résorption de l'os par activation de l'ostéoclastogénèse. Elle exerce également une action inhibitrice sur la production de l'ostéoprotégérine (inhibiteur naturel du RANKL) [2,7]. Au niveau du rein, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auto-régule sa production en exerçant un rétro-contrôle négatif via la suppression de la 1-alpha-hydroxylase et la stimulation de la 24-hydroxylase (Fig. 3) [8].

Par ailleurs, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit sur de multiples tissus autres que le tissu osseux, du fait de la présence ubiquitaire des récepteurs VDR sur les cellules (prostate, rein, ovaire, côlon, cerveau, muscles, lymphocytes, macrophages...) et les muscles. L'effet immunomodulateur de la vitamine D

est lié à la présence de récepteurs VDR sur les lymphocytes T et B où la vitamine D exerce un effet de stimulation sur l'immunité innée et d'inhibition de l'immunité acquise. Son rôle dans la réponse anti-infectieuse a également été décrit [7]. Enfin, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ contrôle de nombreux gènes intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire de cellules saines et cancéreuses [2,8].

C'est la $25(\text{OH})\text{D}$ représentant le stock de vitamine D de l'organisme qui doit être dosée pour savoir si le patient a ou non une carence en vitamine D.

En effet, même si la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est reconnue comme le métabolite actif de la vitamine D, plusieurs études suggèrent d'importantes fonctions physiologiques pour la $25(\text{OH})\text{D}$. D'une part, elle est le substrat pour la formation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, d'autre part, elle semble avoir une activité directe sur l'absorption intestinale du calcium, 200 à 400 fois plus faible que celle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ mais avec des concentrations circulantes 500 à 1000 fois plus élevées [5]. Lors d'une insuffisance en vitamine D, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sérique pourra être normale, élevée ou basse. La mesure de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ n'est donc pas appropriée pour évaluer le statut vitaminique D.

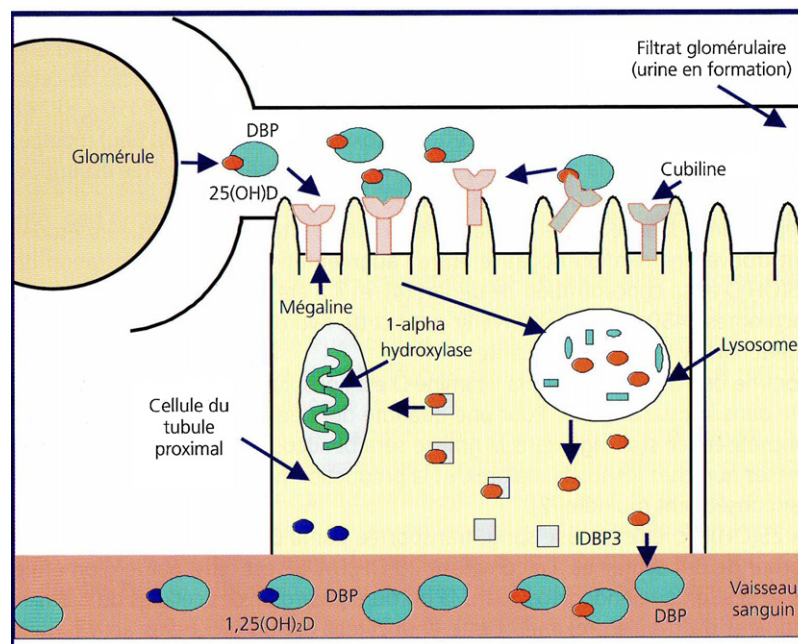


Figure 3 Métabolisme de la vitamine D et ses différents effets biologiques sur le métabolisme osseux. D'après Levy-Weil [3].

Alors qu'il est maintenant consensuel que le statut vitaminique D doit être évalué par la mesure de la 25(OH)D, plusieurs éditoriaux et revues de la littérature ont récemment discuté les valeurs de références (voir la mise au point de J.C. Souberbielle [1] pour plus d'information).

En résumé, les valeurs de référence de la 25(OH)D ne sont pas établies en la dosant dans une population apparemment en bonne santé, comme on le fait pour la majorité des autres paramètres biologiques, mais en essayant de définir la concentration de 25(OH)D :

- au-dessous de laquelle il peut y avoir un risque accru de différents événements indésirables (pas seulement osseux) ;
- au-dessus de laquelle on profitera au mieux des effets bénéfiques potentiels de la vitamine D.

Bien qu'il ne s'agisse pas d'un consensus absolu, la majorité des experts pense qu'il faut avoir une concentration supérieure à 30 ng/mL (soit 75 nmol/L) pour définir un statut vitaminique D « optimal ».

Les seuils les plus fréquemment utilisés sont :

- déficit profond (ou carence) : inférieur à 10 ng/mL (25 à 30 nmol/L) ;
- déficit modéré : 10 à 20 ng/mL (25 à 30 à 50 nmol/L) ;
- insuffisance : 20 à 30 ng/mL (50 à 75 nmol/L).

Il est à noter que la vitamine D est potentiellement toxique. C'est pourquoi, les doses recommandées pour les suppléments sont relativement modestes. Un excès de vitamine D (> 75 ng/mL) aura pour conséquence une augmentation de l'absorption intestinale du calcium. La tendance hypercalcémique qui en résultera freinera la

sécrétion de PTH, ce qui augmentera la calciurie avec des risques rénaux potentiels (lithiase, néphrocalcinose) [5].

Contrairement au dosage de la 25(OH)D, le dosage de la 1,25(OH)₂D ne devrait être prescrit qu'en seconde intention dans le cadre d'un bilan extensif du métabolisme phosphocalcique et plus particulièrement dans certaines indications : hypercalciurie (avec ou sans hypercalcémie) et PTH basse ou normale basse pour éliminer une augmentation de la 1,25(OH)₂D liée à une granulomatose, un diabète phosphaté primitif pour savoir si la 1,25(OH)₂D est élevée (réponse physiologique à une hypophosphatémie) ou non (ce qui peut orienter vers une tumeur) [1].

Les valeurs de références habituelles de la 1,25(OH)₂D varient avec l'âge :

- nourrisson : 30 à 150 pg/mL ;
- enfant plus de trois ans : 20 à 80 pg/mL ;
- adolescent : 30 à 120 pg/mL ;
- adulte : 20 à 60 pg/mL.

Dosages de la vitamine D

Stabilité de la 25(OH)D et de la 1,25(OH)₂D dans le sérum et le plasma [9]

La 25(OH)D et la 1,25(OH)₂D sont très stables dans le sérum et le plasma. Lissner et al. ont montré que les métabolites de la vitamine D sont stables dans le sang conservé à 24 °C pendant 72 heures. Cette stabilité a été également montrée pour des sérums et des plasmas soumis à des cycles de congélation-décongélation [10].

Même si cela n'est pas rapporté pour les immunodosages, il est conseillé d'éviter les tubes avec gel et cela quelle que soit la méthode de dosage [1].

Tableau 1 Performances des méthodes HPLC et LC-MS/MS (d'après Wallace et al. [16]).

Référence	Pourcentage moyen de récupération	Limite inférieure de détection (nmol/L)	Limite inférieure de quantification (nmol/L)	Intervalle de mesure	Répétabilité (CV %)	Reproductibilité (CV %)
HPLC						
Matra-Granados	99–100,2 %	5,2	17,5		0,83 25OHD3 0,92 25OHD2	1,8 25OHD3 1,9 25OHD2
Jakobsen	90,3 %	4		4–200	3,8	5,7
Roth						2,3–6,5 % 25OHD3
Glendenning et al.	88–104 % 25OHD3 86–97 % 25OHD2			7–250	< 10 %	< 12 %
Brunetto	91–98 %	7,5		7,5–80	< 3 %	< 3 %
Turpeinen	85–105 % 25OHD3	3	10	15–200		
Alvarez	88 ± 5,1 % 25OHD3 81,5 ± 4,7 % 25 OHD2	4			< 7,7 25OHD3 < 6 25OHD2	< 10,8 25OHD3 < 11,8 25OHD2
LC-MS/MS						
Knox	89–104 %		4 25OHD3	4–300	< 10 D2 + D3	< 10 D2 + D3
Chen	99 % 25OHD3 95 % 25OHD2	1,2 25OHD3 4,6 25 OHD2		1–250	< 7 % 25OHD3 < 11 % 25OHD2	< 9 % 25OHD3 < 16 % 25OHD2
Saenger	93–103 % 25OHD3 86–92 % 25OHD2	0,2	0,75	2250	< 8 % 25OHD3 < 8,8 % 25OHD2	< 11,5 25OHD2
Tsugawa	104 % 25OHD3 99 % 25OHD2	7,5			5,7 % 25OHD3 4,5 % 25OHD2	2,5 % 25OHD3 5,1 % 25OHD2
Maunsell	91–110 % 25OHD3 94–108 % 25OHD2		< 5 25OHD3 < 5 25OHD2	4–250	5,7 % 25OHD3 4,5 % 25OHD2	2,5 % 25OHD3 5,1 % 25OHD2
Vogeser	91–95 % 25OHD3					< 12 % 25OHD3

Les métabolites de la vitamine D sont peu sensibles aux UV en raison de leur forte liaison à la DBP [9].

La 25(OH)D est extrêmement stable dans le sérum, là aussi probablement en raison de sa liaison à la DBP, rendant inutile des préconisations particulières pour la conservation des échantillons (remarque : les échantillons du contrôle de qualité DEQAS sont envoyés de Grande-Bretagne par la poste, non congelés).

En pratique, si le dosage est effectué dans la journée, l'échantillon (décanté) peut rester à température ambiante. Si le dosage est différé, il est conseillé de conserver l'échantillon décanté à –20 °C [1].

Dosage de la 25(OH)D

Ce dosage qui tend à se développer très largement aujourd'hui est délicat à mettre au point [1,11]. Bien que

« marqués CE », les réactifs ne répondent pas tous aux critères que l'on peut attendre à la lumière des éléments bibliographiques décrits ci-dessus.

Les principales difficultés proviennent du caractère fortement hydrophobe de la 25(OH)D et de son existence sous deux formes à doser, la 25(OH)D2 et la 25(OH)D3 (Fig. 1).

La nature hydrophobe de la 25(OH)D est susceptible d'induire des effets « matrice » très importants ce qui fait que tous les programmes de contrôle de qualité externes qui ne proposent pas de vrais échantillons sériques ne permettent pas de comparer les techniques entre elles. Il est donc conseillé d'utiliser un contrôle de qualité de ce type, comme le programme DEQAS (www.deqas.org) [1].

Par ailleurs, il est important de choisir une technique de dosage qui mesure les deux formes 25(OH)D2 et 25(OH)D3. En France, certains médicaments contiennent de la vitamine D2, d'autres de la vitamine D3. Il n'est pas toujours aisé de

savoir que les patients en ont pris. Une technique qui ne dose que la 25(OH)D₃ sous-estimerait obligatoirement la concentration de 25(OH)D d'un patient qui prend de la vitamine D₂ [12]. Pour les laboratoires qui utilisent une technique qui distingue la 25(OH)D₂ et 25(OH)D₃, il est impératif que la somme des deux formes apparaisse comme résultat principal sur la feuille de résultats [13].

L'Afssaps en 2009 a d'ailleurs émis des recommandations à destination des biologistes concernant la spécificité des dosages de vitamine D recensant les réactifs alors commercialisés et leurs spécificités annoncées. L'Afssaps enjoignait les biologistes de «...vérifier la pertinence des résultats au regard des traitements prescrits et au dispositif de diagnostic in vitro utilisé» [14].

Il n'existe pas de méthode de référence aujourd'hui de dosage de la 25(OH)D, ni de standard international. Les caractéristiques requises pour définir la méthode de référence, qui sera probablement la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie gazeuse ou liquide, ont été proposées [15–17].

Lorsque cette méthode de référence sera clairement établie, il faudra identifier les laboratoires de référence l'utilisant et envisager de standardiser les différentes techniques proposées. Ces comparaisons seront optimisées lorsque les méthodes seront standardisées selon le SRM 972 [16]. Aujourd'hui, cependant, les résultats du contrôle de qualité DEQAS et de certaines études de comparaison des techniques de dosage sont plutôt rassurants car les principales techniques de dosage utilisées dans les laboratoires de biologie médicale donnent en moyenne des résultats qui ne diffèrent que de manière relativement marginale (environ 10%) à condition que les échantillons ne contiennent que de la 25(OH)D₃ et pour des valeurs comprises entre 10 et 40 ng/mL [18].

On peut séparer les techniques de dosage de la 25(OH)D en deux grandes familles : les méthodes séparatives comme l'HPLC ou la spectrométrie de masse et les immunodosages, les plus pratiqués. Les performances des méthodes HPLC et LC-MS/MS sont résumées dans le [Tableau 1](#) [16]. Un certain nombre d'auteurs mettent en avant les avantages des immunodosages, en particulier sur les plates-formes automatisées pour leur praticabilité face à des activités importantes [17,19]. On peut distinguer les trousseaux radio-immunologiques et la grande tendance au développement de réactifs adaptables sur automates de forte diffusion. Néanmoins, une vigilance toute particulière doit être portée sur les spécificités de ces réactifs ; les pourcentages de reconnaissance des différentes formes explicités doivent figurer sur les comptes rendus à destination du clinicien.

Cependant, d'autres auteurs redoutent que ces méthodes, à côté de leur simplicité et automatisation, ne présentent pas les mêmes performances analytiques que l'HPLC, la LC-MS/MS ; ces techniques ne seraient finalement capables que de fournir « de façon semi-quantitative qu'un statut relatif en vitamine D ». Utilisées à bon escient, les trousseaux d'immunodosages constituent des atouts majeurs pour le clinicien mais ne peuvent prétendre à la même qualité que celle des méthodes chromatographiques et de spectrométrie de masse qui nécessitent en revanche, un équipement coûteux et une expertise élevée pour leur utilisation [16].

Dosage de la 1,25(OH)₂D

Les dosages de la 1,25(OH)₂D sont des techniques délicates car elles se heurtent à trois types de problèmes. Elles nécessitent obligatoirement de séparer la 1,25(OH)₂D des autres métabolites de la vitamine D avant le dosage proprement dit.

Il faut souligner que la concentration sérique de la 1,25(OH)₂D est mille fois inférieure à celle de la 25(OH)D ; enfin, elle est fortement lipophile [11].

Actuellement, deux techniques radio-immunologiques sont utilisables [20,21] se distinguant par leurs étapes de séparation. Les méthodes de détection utilisant la spectrométrie de masse après séparation chromatographique représentent l'avenir [11].

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement le Docteur Jean Claude Souberbielle, service d'explorations fonctionnelles, CHU Necker, 75074 Paris cedex 15 pour ses précieux conseils.

Références

- [1] Souberbielle JC. Vitamine D. Editions SEEd; 2010.
- [2] Hollick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357: 266–81.
- [3] Levy-Weil FE. La vitamine D en rhumatologie. *Feuill Biol* 2010;29:445–51.
- [4] Holick MF, Chen TC, Lu Z, et al. Vitamin and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res* 2007;22(Suppl. 2):V8–33.
- [5] Cormier C, Souberbielle JC. New definition of optimal vitamin D status and redefining serum parathyroid hormone reference range. *Rev Med Interne* 2006;27(9):684–9.
- [6] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F8–28.
- [7] Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(2):471–8.
- [8] Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006;96(2):142–6.
- [9] Hollis BW. Assessment and interpretation of circulating 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in clinical environment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39: 271–86.
- [10] Lissner D, Mason RS, Posen S. Stability of vitamin D metabolites in human blood serum and plasma. *Clin Chem* 1981;27: 773–4.
- [11] Hollis BW. Editorial: the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3149–51.
- [12] Cavalier E, Wallace AM, Knox S, et al. Serum vitamin D measurement may not reflect what you give to your patients. *J Bone Miner Res* 2008;23:1864–5.
- [13] Binkley N, Drezner MK, Hollis BW. Laboratory reporting of 25-hydroxyvitamin D results: potential for clinical misinterpretation. *Clin Chem* 2006;52:2124–5.

- [14] Afsapps. Recommandations à destination des biologistes concernant la spécificité des dosages de vitamine D. 2009.
- [15] Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for true-ness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta* 2009;408:8–13.
- [16] Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010;75:477–88.
- [17] Hollis BW, Horst RL. The assessment of circulating 25OHD and 1,25OH₂D: where we are and where we are going. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:473–6.
- [18] Binfley N, Krueger D, Gemar D, et al. Correlation among 25-hydroxyvitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1804–8.
- [19] Hollick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009;19:73–8.
- [20] Clemens TL, Hendy GN, Graham RF, et al. A radioimmunoassay for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clin Sci Mol Med* 1978;54:329–32.
- [21] Fraser WD, Durham BH, Berry JL, et al. Measurement of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D using a novel immunoextraction technique and immunoassay with iodine labelled vitamin D tracer. *Ann Clin Biochem* 1997;34:632–7.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ÉDITORIAL

Le « politiquement correct » en vigueur en France au sujet du mot race et ses répercussions en médecine et en biologie médicale

How French societal considerations may have negative impact on medical practice?

De nos jours, le mot « race » fait l'objet en France de controverses en raison des différentes interprétations humaines quant à la définition biologique et ce, notamment, à cause de certaines dérives idéologiques.

La notion de races humaines est devenue un sujet tabou au point que la suppression du mot race figure dans le projet de texte visant à une réforme constitutionnelle (article 1 de la Constitution). Des instances qui jouent un grand rôle en politique de santé, comme l'HAS et l'Afssaps (devenue l'ANSM), ont emboîté le pas; c'est ainsi qu'une notice, mentionnant que les patients de race noire auraient un traitement moins efficace lors de l'administration d'un anti-hypertenseur, a dû être corrigée; il a été proposé d'utiliser des termes moins stigmatisants mais permettant une bonne information des patients concernés par ces différences potentielles d'efficacité des médicaments.

Dans les pays anglophones comme les États-Unis ou le Canada, le terme race (ou *ethnicity*) demeure utilisé dans le langage courant pour faire référence à l'origine ethnique déclarée par un individu, généralement sans qu'il y ait de consensus sur les divisions admises (« blanc », « africain », « afro-américain », « indien d'Amérique », « hispanique », etc.).

À titre d'exemples, voici quelques publications relevées au hasard :

- prévalence réduite de la fibrillation auriculaire chez les patients de race noire [1];
- disparités raciales et prescription de warfarine [2];
- différences raciales dans la prévalence du placenta praevia [3];
- la race est un facteur de différence pour le diagnostic du cancer de l'utérus [4];

- la race doit être prise en compte dans l'association entre HbA1c et mortalité des adultes sans diagnostic de diabète [5];
- différences raciales devant le thromboembolisme veineux [6].

Au Québec, si l'utilisation du mot « race » (« race noire », « race blanche »...) ne suscite guère de débat, il est toutefois plus convenu d'utiliser dans les discours et les écrits plus formels le terme « origine ethnique », suivi de la nationalité.

En France, l'utilisation dans un cadre officiel d'une mention raciale est interdite, bien que celle de « type », suivie d'une précision géographique (européen, maghrébin, africain, par exemple) soit acceptée. Deux exemples illustrent les difficultés, voire les risques auxquels ce « politiquement correct » peut ou pourrait donner lieu.

En 1985, un dépistage néonatal systématique de la drépanocytose a commencé à être mis en place dans les départements d'outre-mer. En métropole, le dépistage a pu être instauré en 2000 à la condition d'être réalisé de façon ciblée et que la prévalence soit supérieure à 1/1000 chez les nouveau-nés testés. En d'autres termes, ce dépistage est réalisé sur des enfants à risque en raison de « l'origine de leurs parents » (Afrique subsaharienne et Antilles).

Des questions viennent à l'esprit : comment effectuer ce dépistage sans tenir compte de la couleur de la peau et que se passe-t-il dans le cas des Noirs européens ou des Blancs africains?

L'autre exemple concerne le dépistage anténatal du risque accru de trisomie 21 fœtale.

Actuellement ce dépistage passe au premier trimestre de la grossesse par une échographie et par le dosage de marqueurs biochimiques dans le sang maternel (il est exclu

de généraliser un diagnostic sur un caryotype à cause des risques liés au prélèvement des cellules fœtales par amniocentèse et aussi pour des considérations financières).

La population de patientes à risque accru (celles auxquelles sera proposé un caryotype) est mise en évidence à la suite d'un calcul par logiciel où intervient le risque lié à l'âge maternel et des facteurs minorants ou aggravants obtenus à partir de la clarté nucale et des concentrations de PAPP-A (protéine associée à la grossesse) et de β -hCG.

Ce risque « brut » doit être corrigé dans un premier temps en tenant compte de deux facteurs, le poids maternel et le tabagisme ; on obtient un risque « combiné ».

Tout risque combiné supérieur à 1/250 est considéré comme risque accru.

Pour rester dans le domaine du laboratoire, en présence d'un fœtus trisomique, la PAPP-A est nettement plus basse que celle retrouvée chez les femmes non porteuses, la β -hCG est plus élevée.

Il se trouve, en l'absence de fœtus atteint, que les femmes enceintes noires africaines et antillaises sont caractérisées par des concentrations de PAPP-A nettement supérieures à celles des femmes blanches (dites caucasiennes) (l'augmentation de la β hCG est moins importante) [7,8].

Cela veut dire qu'il faut appliquer un facteur de correction supplémentaire dans le cas des patientes « afrocaribéennes » si on veut éviter des faux positifs et des faux négatifs.

Le problème se pose pour les responsables des logiciels qui, ne pouvant proposer « race noire », n'auraient à leur disposition que « origine géographique ».

Mais alors que devient le calcul pour une patiente blanche vivant à Fort-de-France ou à Bamako ?

Conclusion

Ces quelques exemples montrent que les aspirations sociétales, dont les objectifs peuvent être louables, ne sont pas toujours exemptes de retombées négatives dans les domaines de la médecine et de la biologie médicale.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Upshaw CB. Reduced prevalence of atrial fibrillation in black patients compared with white patients attending an urban hospital: an electrographic study. *J Natl Med Assoc* 2002;94(4):204–8.
- [2] Schauer DP, Johnston JA, Moomaw CJ, Wess M, Eckman MH. Racial disparities in the filling of warfarin prescriptions for non-valvular atrial fibrillation. *Am J Med Sci* 2007;333(2):67–73.
- [3] Kim LH, Caughey AB, Laguardia JC, Escobar GJ. Racial and ethnic differences in the prevalence of placenta praevia. *J Perinatol* 2011;32(4):260–4.
- [4] Matthews R, Azuero A, Asmellash S, Brewster E, Partridge EE, Piyathilake GJ. Usefulness of serum mass spectrometry to identify women diagnosed with higher grades of cervical intraepithelial neoplasia may differ by race. *Int Womens Health* 2011;3:185–92.
- [5] Kehl KG, Findeisen HM, Fardo DW, Bruemmer D, Mannino DM, Sanderson WT. Race-ethnicity as an effect modifier of the association between HbA1c and mortality in US adults without diagnosed diabetes. *Eur J Endocrinol* 2011;165(2):275–81.
- [6] Zakai NA, McClure LA. Racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2011;9(10):1877–82.
- [7] Kagan KO, Wright D, Spencer K, Molina FS, Nicolaides KH. First trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31(5):493–502.
- [8] Cowans NJ, Spencer K. Effect of gestational age on first trimester maternal serum prenatal screening correction factors for ethnicity and IVF conception. *Prenat Diagn* 2013;33(1):56–60.

J. Ingrand

267, village nord, 31370 Sajas, France

Adresse e-mail : ingrand.jacques@wanadoo.fr

Reçu le 12 février 2013

Accepté le 25 février 2013



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUE GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

La médecine génomique, une réalité en pleine évolution. Première partie

Genomic medicine, an evolving reality. First part

J. Lamoril^{a,*}, M. Bogard^b

^a Département de génétique moléculaire, hôpital Bichat, hôpitaux universitaires Paris Nord Val-de-Seine, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France

^b Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, centre hospitalier d'Argenteuil, 95100 Argenteuil, France

Reçu le 30 novembre 2012 ; accepté le 19 décembre 2012

KEYWORDS

Genome;
Exome;
Epigénome;
Héritabilité

MOTS CLÉS

Génome ;
Exome ;
Épigénome ;
Héritabilité

Summary After completion of the first human genome in 2004, decoding of the human genome is continuing. Its analysis in human diseases has already been carried out for many years in different medical fields among which are hereditary diseases or for instance oncology (in the latter case, especially for targeted medicine). However, improved molecular tools among which are new generation sequencers (NGS), arrived in 2005 in the medical research field allowing a wider and more complete analysis of human genome. NGS permits completion of many different human genomes and deep genome analysis in many human diseases leading to the discovery of new genes, new disease mechanisms and designing of new therapeutic targets at the molecular level. These instruments lead also to the creation of direct testing to consumer genomics (DTC) and the possibility in certain countries of open genomic analysis by private companies. While NGS was mainly confined to research laboratories until very recently, some hospital laboratories are beginning to buy these machines. Therefore, with the increasing pace of genetic discoveries and the place molecular genetics is taking in medicine, the so-called genomic medicine is beginning to become a reality in all the medical fields. In order to clarify this major evolution, we are presenting the first article out of three on genomic medicine, its applications and future to enlighten the reader on this new matter.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Après la description du premier génome humain achevé en 2004, le décryptage de ce dernier se poursuit. L'analyse du génome humain en médecine est déjà réalisée depuis de nombreuses années dans plusieurs domaines tels que les maladies héréditaires par exemple ou les cancers (médecine individualisée). Néanmoins, l'arrivée de nouveaux outils d'analyse du génome comme les séquenceurs de deuxième génération sur le marché depuis 2005, permettent une analyse plus large de celui-ci, ces machines ayant pris une place importante en

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : jerome.lamoril@bch.aphp.fr, jerome.lamoril@free.fr (J. Lamoril).

recherche clinique comme par exemple en cancérologie, dans l'analyse des maladies rares, le domaine infectieux ou dans le cadre d'études épidémiologiques. La prescription de l'analyse d'un génome humain individuel peut même être obtenue sans ordonnance dans certains pays (analyse génomique libre). Par conséquent, devant la place croissante de l'analyse d'un génome en médecine soit en partie (exome ou analyse ciblée de plusieurs gènes) soit en totalité (génome entier), il nous a paru important de faire le point dans ce domaine en pleine expansion d'autant plus que sa mise en place en milieu hospitalier et non plus en recherche a récemment démarré. Cette première partie reprend en la survolant certains aspects de la connaissance actuelle du génome humain qui nous paraissent importants afin de percevoir les difficultés actuelles de son décryptage et les limites qui en découlent dans l'interprétation de l'analyse d'un génome.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

À l'ère du décryptage du génome humain dans sa totalité tant sur le plan descriptif que fonctionnel dans les laboratoires de recherche fondamentale et clinique et de l'expansion des laboratoires privés vantant les mérites d'une telle analyse chez chaque individu, il nous a paru important de faire le point sur nos connaissances actuelles et sur l'avenir de cette nouvelle application de la biologie. Cette génomique individuelle est présente dans le domaine médical où elle prend une part croissante dans certaines pathologies mais aussi dans celui non médicalisé et actuellement non réglementée en France ou ailleurs, mais largement diffusée dans un grand nombre de pays occidentaux (hors de France). Cette part non médicalisée de la médecine individuelle est proposée par des sociétés privées dans le cadre de ce que les anglo-saxons appellent l'analyse génomique libre (DTC, *direct testing to consumer genomics*). Celle-ci prend une place croissante mais encore mal délimitée. Moyennant finance et sur demande individuelle (sans prescription médicale et en dehors de toute recherche clinique), ces sociétés analysent un génome et rendent une série de données génotypiques comportant les risques ou les protections génétiques relatives censées être inscrites dans notre génome et transmissible à notre descendance. La génomique individuelle comprend donc différents aspects, un aspect médical avec la médecine personnalisée et une médecine libre accessible à tous sans prescription médicale. Afin d'éclairer le lecteur sur cette nouvelle médecine individuelle qu'on pourrait appeler médecine génomique, nous avons rédigé trois chapitres expliquant dans sa globalité l'état actuel des connaissances et l'évolution rapide de leurs indications tant en milieu hospitalier que privé dans les années à venir. Cette première partie plus générale est un survol de certains aspects importants des découvertes récentes sur le génome afin d'éclairer le lecteur sur la difficulté que constitue le décryptage de notre génome. La deuxième partie évoquera les techniques actuellement utilisées et leurs évolutions et la troisième partie fera le point de l'état de la médecine génomique actuelle, son développement à venir et évoquera les problèmes éthiques, légaux et de société liés aux firmes de service de génomique dans ces indications.

Analyse de génomes dans le cadre de recherche : exemples récents

Cas clinique 1

Un garçon de 15 mois est hospitalisé pour une inflammation du rectum (proctite), de nombreux abcès périanaux et une diarrhée majeure aboutissant à un amaigrissement important. Malgré les antibiothérapies à répétition, les abcès périanaux ne cicatrisent pas. Le tableau clinique évoque rapidement une colite inflammatoire évoquant une maladie de Crohn. Au cours des mois qui suivent et malgré une antibiothérapie répétée et une nutrition entérale, la pathologie s'aggrave. Un traitement par anti-TNF alpha (*tumor necrosis factor alpha*) est alors prescrit, une maladie de Crohn étant suspectée. Malgré cela, une colostomie de décharge est réalisée. Mais, celle-ci n'améliore pas le traitement et présente de nombreuses complications qui imposent une nutrition parentérale au long cours afin d'éviter l'aggravation de la dénutrition et de permettre la guérison des complications de la colostomie. Environ cinq mois après ce tableau, l'enfant est perdu de vue par l'équipe qui ne le revoit qu'à l'âge de quatre ans dans un tableau de grande dénutrition et de nombreuses fistules colo-cutanées périanales, l'ensemble se présentant dans un tableau d'infection grave. Après stabilisation de son état, une colectomie totale est effectuée avec iléostomie terminale. De nombreuses complications locales émaillant l'évolution (récidives de fistules notamment), un traitement immunosuppresseur par tacrolimus est mis en place permettant une rémission. Bien qu'exceptionnel à cet âge, un tableau de maladie de Crohn et/ou de déficit immunitaire avait donc été suspecté et une enquête immunologique complète réalisée ainsi que l'analyse moléculaire des gènes impliquées dans des tableaux de colites inflammatoires. Toutes ces analyses avaient rejeté ces différentes hypothèses. Devant ce dysfonctionnement immunitaire d'étiologie inconnue, le tableau clinique catastrophique et la nécessité de trouver une alternative à un traitement lourd qui ne pourra pas être prolongé indéfiniment, l'équipe en charge de ce patient décide d'analyser son exome afin d'identifier si possible la cause précise et trouver un traitement adapté [1]. L'analyse

permet alors de caractériser la mutation causale, p.C203Y (acide aminé cystéine muté en tyrosine en position 203 de la protéine) dans le gène codant pour la protéine XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*, Omim 300079) situé sur le chromosome X (mutation hémizygote). Cette protéine joue un rôle majeur dans la réponse pro-inflammatoire en activant les différents signaux inflammatoires après stimulation du système immunitaire inné régulé par les protéines NOD et la voie NFκB. Schématiquement, la mutation induit une réponse inflammatoire inadaptée et « surdimensionnée » aux bactéries commensales du tube digestif. Jusqu'à l'analyse de ce patient, cette protéine n'était pas connue pour donner un tel tableau clinique (même si certaines publications sur ce gène rapportaient des signes d'accompagnement à type de colite), ce gène étant impliqué dans la lymphohistiocytose hémophagocytaire (Omim 300635). À l'origine, le gène *XIAP* n'était pas dans la liste des gènes candidats susceptibles d'induire ce tableau gravissime. L'origine moléculaire du tableau clinique étant identifiée, une greffe de moelle fut entreprise améliorant considérablement le tableau clinique du patient au bout de plusieurs mois. Sans séquençage d'exome, l'origine de la pathologie et le traitement adapté n'auraient jamais pu être obtenus [1].

Cas clinique 2

Une femme de 39 ans atteinte de leucémie myéloïde aiguë en première rémission est hospitalisée en vue d'une transplantation allogénique de cellules souches. Dans le cadre du bilan, l'analyse cytogénétique des cellules prélevées dans la moelle révèle des modifications complexes [46 : XX, del(9)(q12q32), del(12)(q12q21), -6, -16, add(16)(p13.2), +2mar(13/20 cellules)] dont le pronostic à long terme est évalué à 15 % de survie. Par ailleurs, les anomalies cytologiques observées en technique *fluorescent in situ hybridization* (FISH) étaient compatibles avec une leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), cette dernière étant associée dans plus de 90 % des cas à une translocation t(15;17) et la présence dans la grande majorité des cas du transcrit de fusion PML-RARA (d'autres transcrits associant RARA et un autre gène sont plus rarement décrits dans cette pathologie). Chez cette patiente, ce transcrit n'avait pas été recherché dans l'hôpital dont elle provenait et les échantillons cryopréservés par l'hôpital initial étant de mauvaise qualité, ne permettaient pas d'analyser l'ARN. Par ailleurs, en rémission, la patiente était négative pour le transcrit PML-RAR. Sous traitement approprié, une rémission est obtenue mais un traitement de consolidation par trioxyde d'arsenic est également prescrit (traitement utilisé dans la LAP). La discussion d'un traitement adapté et la recherche d'un éventuel transcrit pour lequel un traitement ciblé pourrait être entrepris amènent l'équipe hématologique à demander un séquençage tout génome (génomique entier) des cellules prélevées dans la moelle [2]. Un prélèvement cutané de la même patiente est également prélevé pendant la rémission pour cette analyse : il a servi de génome de référence normal pour la patiente. Parmi les anomalies retrouvées, l'analyse génomique a identifié 3 nouveaux transcrits, PML-RARA, LOXL1-PML et RARA-LOXL1 (confirmés dans un second temps par RT-PCR et, pour les transcrits PML également par FISH). Parmi ceux-ci, le transcrit PML-RARA était un nouveau

transcrit non décrit, par ailleurs non observable avec les techniques de RT-PCR utilisées. Les anomalies observées en cytogénétique (excepté les délétions des chromosomes 6 et 16) ont également été confirmées par le séquençage. D'autres anomalies non observées en cytogénétique ont été aussi caractérisées : inv(6)(p22,3;q14,1) et une translocation t(6;16)(q22,31;p13,3). L'analyse génomique put conclure à la présence de deux clones de cellules tumorales et 12 mutations somatiques furent aussi identifiées pour lesquelles le lien avec la pathologie était inconnu. Ce résultat obtenu en huit semaines environ a permis d'optimiser le traitement pour la patiente. Il n'y avait plus d'indication à une greffe de moelle et l'équipe décida un traitement par chimiothérapie. Quinze mois après ce traitement, la patiente était toujours en rémission (l'article ayant été rédigé dans ce délai, nous n'avons pas d'information sur l'évolution au-delà de ce temps). La découverte du transcrit PML-RARA était fondamentale pour la patiente, ce transcrit ayant un rôle pronostic favorable majeur et le traitement chimiothérapique adapté aux résultats, efficace. Par ailleurs, le diagnostic de LAP a pu être définitivement établi. Sans séquençage du génome entier, le traitement et donc le pronostic pour la patiente auraient été totalement différents [2]. Dans un laboratoire de référence, ce transcrit aurait pu être mis en évidence aussi et cela sans passer par la technique encore coûteuse de séquençage génome entier. Néanmoins, la mise en évidence par les techniques moléculaires « classiques » auraient été lourdes, complexes et plus longues. Au moment de la description de ce cas clinique (soit en janvier 2011), le coût rapporté par les auteurs pour l'analyse a été évalué à 40 000 US dollars (environ 34 000 euros).

Cas clinique 3

Afin d'évaluer l'intérêt de prescrire l'analyse d'un génome entier chez un sujet « tout venant » en consultation, une équipe hospitalière a décidé d'effectuer celle-ci chez un homme de 40 ans présentant une histoire familiale de maladie cardiovasculaire (maladie coronarienne et mort subite chez plusieurs membres) [3]. Ce sujet était en bonne santé et ne présentait aucune pathologie ni facteur de risque apparents. Les bilans clinique, biologique et d'imagerie étaient tous normaux. Parmi les résultats obtenus au cours de l'analyse de son génome, il a été observé par exemple des variants rares dans deux gènes impliqués dans la fonction cardiaque et notamment associés entre autres, au risque de mort subite et de cardiomyopathie. Il s'agissait des gènes *TMEM43* (*Transmembrane protein 43*) et *DSP* (*desmoplakine*). Par ailleurs, il présentait aussi des variants dans les gènes *HFE2* et *HFE* associés à l'hémochromatose (son bilan martial et l'exploration hépatique étaient normaux et il n'existait aucun antécédent familial de surcharge en fer). Une mutation codon stop à l'état hétérozygote dans le gène codant pour CDC73 (parafibromine) impliqué dans les tumeurs de la parathyroïde et l'hyperparathyroïdie (à l'état homozygote) a aussi été retrouvée. On peut ainsi imaginer que ce sujet en cas de perte d'hétérozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) par mutation somatique pourrait développer l'une ou l'autre pathologie de la parathyroïde. L'analyse des gènes impliqués dans la réponse à différents

médicaments (domaine de la pharmacogénomique) révélait entre autres des variants associés à la réponse aux traitements par des anticoagulants et aux hypolipémiants. L'ensemble des risques observés et pris isolément sont néanmoins faibles (en moyenne, risque $\times 1,2-1,5$ par rapport au sujet sans ces variants). Afin d'évaluer les risques majeurs du sujet, les auteurs ont utilisés plusieurs modèles d'analyse statistique et génétique et ont recherché les variants ou groupe de variants (présents pour une même pathologie) multipliant par 2 ($\times 2$) ou diminuant de moitié ($\times 0,5$) le risque génétique *a posteriori* (*post-test probability*) de développer certaines maladies. Ils ont retrouvés huit variants ayant un risque supérieur à 2 et sept variants avec un risque inférieur à 0,5 [3]. Les auteurs retrouvent par exemple un risque augmenté d'obésité, de maladie coronarienne et de diabète de type 2. Le patient étant en bonne santé et ayant un bilan lipidique normal, il ne nécessitait aucun traitement médical préventif malgré les risques génétiques présents. Des conseils de mode de vie saine suffisaient (pas de tabac, activité physique régulière, alimentation équilibrée notamment). L'analyse pharmacogénétique ayant démontré la présence de variants de réponse aux traitements notamment anticoagulants permettra en cas de nécessité d'un tel traitement d'adapter ce dernier en fonction des résultats génétiques. Cette étude datant de mai 2010 montre la difficulté d'analyse d'un génome entier, souligne l'absence de données épigénétiques et environnementales. Ils concluent à la nécessité d'intégrer au cours des études à venir les données obtenues par analyse génomique aux données clinico-biologiques pour permettre une analyse réellement informative et individualisée [3].

Cas clinique numéro 4

Un nouveau-né (patient 1) est transféré d'un hôpital général vers un hôpital spécialisé au service de réanimation néonatal. Au premier jour de l'admission, une infection par un staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*), résistant à la méthicilline, apparaît chez ce dernier. Les analyses de microbiologie classique sur plusieurs isolats sont réalisées notamment un antibiogramme révélant un profil inhabituel de résistance avec notamment des résistances à la méthicilline, la céfotixime, l'érythromycine, la ciprofloxacine, la gentamycine et la mupirocine. Cet antibiogramme différait de ceux obtenus sur d'autres patients de l'hôpital ou d'épidémies en Grande Bretagne (cette étude provient de l'hôpital universitaire de Cambridge). Des mesures de contrôle de l'infection ont alors été immédiatement mises en œuvre ainsi qu'un protocole d'éradication de la bactérie. Un second patient (patient 2) est admis une semaine plus tard, initialement non infecté par la bactérie du premier patient. Malheureusement, ce patient est contaminé par la même bactérie 37 jours plus tard avec les mêmes résistances inhabituelles que le premier patient. Une transmission inter-patient est immédiatement évoquée. Chez le patient 1, une bactériémie se développe au 77^e jour après l'admission. Une enquête complète est alors entreprise pour déterminer l'origine de la contamination par ce germe hautement résistant avec analyse du personnel hospitalier (médical et non médical) du service et chez les nouveau-nés. Dans le service contenant 17 lits et un personnel de 181 personnes, quatre

enfants furent immédiatement retrouvés contaminés (dont trois avec le même profil antibiogramme) puis 13 jours plus tard, sept autres avec un profil antibiogramme identique au patient 1. Trois membres du personnel furent retrouvés contaminés (avec un profil antibiogramme différent). La fermeture du service fut alors décidée. Les isolats recueillis après bactériémie du patient 1 ainsi que de six autres patients suspectés d'être de la même source ainsi que sept autres patients suspectés d'être infectés par une souche différentes (deux infectés dans le service par un staphylocoque méthicilline résistant avant l'arrivée du patient 1 et cinq autres infectés dans d'autres services) ont alors été séquencés sur un séquenceur nouvelle génération [4]. Un séquençage complet du génome des bactéries isolées a alors été entrepris et le résultat des analyses comparé à un génome de référence de la bactérie (isolat HO 5096 0412). Au total, 14 génomes bactériens ont été analysés. L'analyse phylogénétique des souches isolées a permis de démontrer que les bactéries associées au patient 1 et aux autres contaminés de l'unité de réanimation étaient identiques. Trois souches provenant de trois patients différents issus d'autres services, présentaient des caractéristiques différentes et n'étaient donc pas liés à l'épidémie de l'unité. Chacune de ces trois souches étant différentes chez ces trois patients, leur infection n'était pas non plus liée entre eux. Chez ces trois patients, l'infection était indépendante l'une des autres. L'analyse génomique a pu confirmer l'épidémie et relier les patients contaminés entre eux. Elle a permis aussi d'analyser le profil de résistance de la bactérie responsable (le résistome). L'analyse génomique confirmait l'analyse phénotypique (l'antibiogramme). De la même manière, l'analyse des toxines bactériennes (le toxome) a été entreprise. Cette étude prouve que l'analyse du génome bactérien dans le cadre d'une épidémie peut être réalisée, que l'analyse phylogénétique des souches séquencées permet de confirmer cette épidémie et d'obtenir des informations complémentaires sur la résistance aux antibiotiques et les toxines secrétées par l'agent infectieux responsable. Bien que concordant dans les analyses avec les antibiogrammes réalisés, les séquençages du génome bactérien apportaient des informations complémentaires. En conclusion, cette étude démontre la faisabilité et la rapidité d'une analyse par séquençage de génome bactérien dans le cadre d'une infection nosocomiale. En effet, le résultat de l'analyse a été obtenu ici deux jours environ après la mise en culture (hémocultures) et a coûté 150 dollars américains par isolat en juin 2012, de la préparation de l'échantillon jusqu'au séquençage inclus. Les informations obtenues par séquençage du génome bactérien entier tant sur le plan épidémiologique que des caractéristiques de la bactérie causale aurait nécessité un temps bien plus long et des moyens tant techniques qu'humains plus lourds avec les techniques classiques de bactériologie [4].

Analyse de génomes dans un cadre privé

Plusieurs sociétés dont nous reparlerons dans la troisième partie de cet article, proposent des services de séquençage à titre privé. Ainsi, si une personne souhaite connaître les risques qu'il encoure sur le plan de sa santé, il peut faire appel à une société privée d'analyse génomique. Ces sociétés

annoncent pouvoir prédire les risques de santé avec une grande exactitude à partir du séquençage de l'échantillon fourni par le client. Par exemple, la société américaine 23andMe (www.23andme.com) basée en Californie annonce sur son site pouvoir analyser un génome pour environ 300 dollars américains (chiffre septembre 2012). Il ne s'agit pas dans ce cas particulier d'un séquençage complet du génome mais d'une analyse d'un grand nombre de variants sur certaines zones du génome (la société annonce explorer un millions de variants avec une précision de 98%). Selon leurs informations, il suffit de s'inscrire sur internet. Après réception du kit envoyé par leurs soins, un recueil de votre salive est réalisé. L'échantillon est envoyé par vos soins à la société aux États-Unis (dans un délai d'un an, date de péremption du kit). La société annonce rendre les résultats en deux à trois semaines. Ceux-ci sont accessibles sur leur site sécurisé. Aucun résultat n'est envoyé par courrier postal ou électronique. Un certain nombre de pathologies à composante héréditaire sont testés (243 risques ou pathologies, en pratique). Les résultats sont envoyés sans interprétation et sous forme de génotypes. En cas de génotype théoriquement associé à une pathologie ou à un facteur de risque (par exemple, en pharmacogénomique) et en tenant compte des publications scientifiques (selon leurs informations), la société annonce pour un génotype donné, un risque s'il existe. Néanmoins, aucun diagnostic n'est donné et en cas d'un risque identifié, la société suggère au client de contacter un médecin.

Le génome humain en 2012 : vue générale

Bien qu'annoncé officiellement en 2001 [5], le séquençage quasi complet du premier génome humain s'est achevé à 99% en 2004 [6,7]. Cette séquence était issue d'une mosaïque de génomes humains (et non d'une seule personne). Les analyses de génomes humains ont établi que la population humaine est identique au niveau du génome à 99,5%. Par conséquent, seulement 0,5% de notre génome diffère entre les sept milliards d'individus environ qui peuplent la planète. En juillet 2012, 21 224 gènes codants (contenant 679 045 exons et 194 015 transcrits), 14 427 pseudogènes, 15 952 gènes non codants (gènes ARN), étaient recensés (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/StatsTable). Pour mémoire, les gènes codants codent pour les protéines. La différence observée entre le nombre de gènes codant (21 224) et le nombre de protéines observées à ce jour est expliquée essentiellement par les épissages alternatifs au cours de la maturation de l'ARN messager (ces derniers sont issus de la transcription de l'ADN génomique). De nombreux variants ont été détectés (Tableau 1) : le nombre de variants tant à l'échelle du nucléotide (SNP, *single nucleotide polymorphism* et petites insertions et/ou délétions) que du variant structurel de plus grande taille (CNV, *copy number variant*) continue d'évoluer. Ils sont répertoriés dans de grandes bases de données mondiales. Pour déterminer ces séquences, de nombreux défis durent être résolus tels que les séquences quasi homologues (séquences très proches) ou les séquences répétées par exemple. Comme indiqué plus haut, le génome humain est légèrement différent d'un individu à un autre (> 99,5%

d'identité entre deux humains quelle que soit l'origine ethnique et géographique) sauf chez les vrais jumeaux dont le génome est identique à la naissance (« clones » naturels). Cette variabilité est appelée polymorphisme quand elle n'induit pas de maladie. Nous possédons tous de nombreux polymorphismes tant à l'échelle du nucléotide (SNP) qu'à l'échelle structurelle du génome (délétion ou insertion de plus ou moins grandes parties du génome, CNVs). Ces variants sont transmis à la descendance (héréditaires). Par ailleurs, le génome humain partage un grand nombre de gènes avec d'autres organismes. Par exemple, environ 50% de nos gènes se retrouvent chez la mouche, 40% chez le ver de terre, 80% chez la souris et environ 96% chez le chimpanzé. Si nous prenons la souris qui partage donc environ 80% de son génome avec nous, nous possédons le même nombre de gènes et pour les gènes communs aux deux espèces (homme et souris), la même organisation (introns et exons), une séquence nucléotidique très proche (on dit bien conservée). Cependant, environ un quart des épissages alternatifs sont spécifiques de l'une ou l'autre espèce indiquant que des protéines spécifiques d'espèce expliquent au moins en partie la différence entre les deux organismes. L'exemple de la mouche commune est aussi intéressant. De nombreux gènes du développement de l'organisme mais aussi du vieillissement sont quasi identiques entre celle-ci et l'espèce humaine. Soixante et un pour cent de gènes mutés dans 300 maladies sont retrouvés chez la mouche. Parmi ces derniers, on retrouve des gènes impliqués dans le cancer de la prostate, du pancréas, des hémopathies ou la mucoviscidose par exemple. Depuis 2003, de nouvelles technologies de séquençage sont apparues et ont révolutionné l'analyse du génome humain : on parle de séquenceurs de nouvelles génération (NGS, *next generation sequencer*). Ces technologies toujours en évolution, ont permis d'analyser un grand nombre de génomes individuels [8]. Parmi les nombreuses analyses publiées, on peut citer le génome de Craig Venter publié en 2007 [9]. Son génome de 2,8Gb révéla que ce dernier présentait des variants hétérozygotes associés à des maladies cardiovasculaires, à l'hypertension (il a d'ailleurs une histoire familiale de maladie cardiovasculaire) mais qu'il possédait aussi des variants hétérozygotes protecteurs de ces mêmes pathologies. Comment interpréter ces divers résultats à savoir l'équilibre/déséquilibre entre facteurs protecteurs et de susceptibilités aux pathologies cardiovasculaires ? À ce jour, il n'existe pas de réponse à cette question. Ce même sujet est aussi hétérozygote pour un allèle nul (non exprimé) du gène *GSTM1* dont le rôle dans le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques (des agents chimiques) est fondamental. Il présente donc un risque élevé de susceptibilité à l'action de toxines de l'environnement et au développement de cancers. Un autre génome, celui du célèbre James D. Watson, prix nobel de médecine pour la découverte de la double hélice de l'ADN a également été publié en 2008 [10]. Il s'agissait du premier génome individuel analysé par les séquenceurs « nouvelle génération » (celui de Craig Venter l'avait été par la traditionnelle méthode de Sanger). Parmi les résultats de cette analyse, 32 variants associés à des maladies héréditaires étaient retrouvées, 12 d'entre elles étant liées à des maladies de transmission récessive autosomique (telles que la rétinite pigmentaire, le syndrome néphrotique congénital) et les

Tableau 1 Données générales sur le génome humain. [www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/StatsTable; projects.tcag.ca/variation; 7].

	Données actuelles ^a	Variabilité inter-individuelle
Taille	3.300.551.249 pb (\approx 3.3 gigabases) Génome mitochondrial : 16.5 kb	20 Mb (moyenne 250 kb)
Nombre de chromosomes	23 paires (= 46 chromosomes) dont 2 chromosomes sexuels X et Y	—
Nombre de gènes codants	21 224	?
Nombre d'exons	679 045	?
Nombre de transcrits de gène ^b	194 015	?
Nombre de facteurs de transcription	4105	
Nombre de pseudogènes	14 427	?
Nombre de gènes non codants (ARN)	15 952	?
Immunoglobulin/T, segments des gènes du récepteur de la cellule T et des immunoglobulines	625	?
Nombre de variants simple brin (SNP) recensés ^c	60 484 341	
Densité moyenne d'un SNP	1/Kb	1–10/Kb
Nombre moyen de SNPs par individu	3 100 000	3,106–11,106
Nombre de variants de copies de gènes (CNV)	6 303 392 179 450	
Nombre de mutations de novo/individu	150	
Nombre de mutations de novo délétères/individu (dans les gènes codants)	2	1–74
Nombre de cross-over (chiasmata) par méiose	80 chez la femme 50 chez l'homme	50–100 chez la femme 30–70 chez l'homme

SNP : *single nucleotide polymorphism* (*polymorphisme simple base*) ; Kb : kilobase (1000 bases) ; CNV : *copy number variant*, variation du nombre de copie de gène (ou de fragment de génome) (variant de 50 pb à > 1Mb).

^a Ces valeurs évoluent avec l'évolution de la connaissance de notre génome.

^b Le nombre de transcrits est supérieur au nombre de gène. Cette différence est la conséquence des épissages alternatifs des ARNm issus des gènes codants.

^c Certains SNPs recensés nécessitent encore des validations (selon le projet 1000 genome (http://browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Info/StatsTable?db=core), 45 110 070 sont actuellement validés).

20 autres associées à des risques variables de maladies dites communes (non mendéliennes). Bien entendu, d'autres génomes individuels ont été séquencés depuis dans différentes ethnies. Un certain nombre de génomes issus d'Afrique ont ainsi été étudiés. Parmi les ethnies africaines analysées, on peut citer des génomes issus de population Yoruba (Nigéria), Khoisan et Bantu (Afrique du sud), de groupes ethniques du désert du Kalahari [8]. L'analyse des diversités génétiques est fondamentale pour la médecine de demain notamment pour les implications qu'elles amènent dans le domaine de la prévention, du diagnostic et du traitement. En effet, il est important de connaître ces variants pour déterminer ce qui est sans conséquence pathologique de ce qui est inducteur de maladie soit directement (mutation) soit indirectement (variant de susceptibilité). C'est une raison majeure qui explique le séquençage tout génome à grande échelle réalisée dans de nombreuses ethnies différentes issues de chaque continent.

Les génomes africains

Les analyses génétiques récentes ont démontré que l'homme dit moderne (*homo sapiens*) est d'origine africaine. L'Afrique est donc le berceau de l'humanité et ce berceau se situerait en Afrique de l'est. Les analyses

génétiques ont en effet démontré une grande variabilité génétique chez les Africains et seulement une portion de cette diversité est retrouvée chez les non-africains. Les analyses génétiques ont porté sur un grand nombre de marqueurs situés sur les autosomes (chromosomes non sexuels), l'ADN mitochondrial (d'origine maternelle) et le chromosome Y (d'origine paternelle) [11]. De nombreuses études ont été menées. Elles aboutissent à la conclusion que la migration hors d'Afrique s'est effectuée environ entre 60 000 et 70 000 ans avant Jésus Christ et se serait fait en peu de vagues [12]. D'autres études ont aussi montré la diffusion de nombreux groupes dans toute l'Afrique avant la migration hors de ce continent. La grande diversité génétique observée sur ce continent s'explique notamment par l'isolement géographique des populations au cours de leur migration intra-africaine, les conditions différentes de vie tant sur le plan environnemental (forêts tropicales, déserts, zones arides...) que culturel, la taille variable des populations (avec des diminutions suivies d'expansion rapide), les mutations aléatoires au niveau génétique ont toutes contribué à la diversité génétique plus importante observée sur le continent africain. La diversité est telle sur le plan génétique que pour certaines ethnies africaines, il existe une plus grande diversité entre africains qu'entre européens et asiatiques par exemple [13]. L'analyse de génomes de sujets africains est donc très importante pour comprendre cette

diversité. Le premier génome complet d'un sujet africain date de 2008 : il s'agissait d'un nigérian (anonyme) [14]. La diversité des populations en Afrique implique donc la nécessité d'analyser de nombreux génomes. Malheureusement, les nombreux problèmes politiques du continent sont des obstacles à ces études. Néanmoins, récemment, un programme d'analyse des populations africaines a été lancé par le NIH américain (l'équivalent de l'Inserm en France) et le fonds privé anglais Wellcome Trust. Il s'agit du projet Human Heredity and Health in Africa démarré en 2009.

Les génomes asiatiques

Le premier génome d'un sujet asiatique a été publié en 2008. Il s'agissait d'un chinois d'ethnie Han [15]. Puis, d'autres génomes issus de cette région du monde ont été étudiés par exemple des génomes individuels d'origine coréenne [16,17]. Ainsi, dans la population coréenne étudiée, il semble que certains traits leur soient communs comme le trait du cérumen sec des oreilles et certains traits utiles en pratique pharmacogénétique.

Complexité du génome humain et diversités de son origine

Bien que comme précédemment indiqué, l'origine africaine de l'être humain apparue il y a 150 000 à 200 000 années en Afrique de l'Est est vraie, certaines découvertes complètent cette hypothèse acceptée par tous. Pour rappel, on considère actuellement que le plus récent ancêtre commun entre les hominidés serait apparu il y a environ 1,5 millions d'années. En effet, le génome de l'homme de Néandertal séquencé en 2006 [18,19] révèle qu'environ 1 à 3 % du génome des eurasiens est d'origine néanderthale [20]. Pour rappel, l'homme de Néandertal (*homo neanderthalensis*) aurait vécu il y a environ entre 250 000 et 28 000 ans. D'après les analyses génétiques récemment obtenues, il y aurait eu un mélange entre l'homme moderne (*Sapiens sapiens*) à sa sortie d'Afrique et l'homme de Néandertal quelque part au Moyen Orient [21]. D'autres séquences d'hominidés (dont l'homme moderne est issu) ont été obtenues telles celles issues de restes d'un autre hominidé, l'homme de Denisova qui aurait vécu entre un millions d'années et 40 000 avant JC en Sibérie du sud et dont des traces ont été retrouvées dans l'analyse de génomes humains de Papouasie Nouvelle-Guinée, d'Océanie et d'Asie du Sud est [20]. Ainsi, les dernières études considèrent qu'environ 1-3 % du génome des Eurasiens et des Amérindiens est d'origine néanderthale et que 3,5 % du génome des natifs d'Australie et de Papouasie Nouvelle-Guinée est d'origine l'homme de Denisova [22]. Ces mélanges d'ADN avec d'autres hominidés semblent aussi exister en Afrique [20]. L'homme moderne n'était donc pas complètement isolé à l'origine des autres hominidés. De nombreux arguments laissent penser qu'un mélange (même modeste) avec du génome d'autres hominidés est fort probable sur tous les continents [20]. Néanmoins, les analyses actuelles incluant celles de l'homme de Néandertal sont encore insuffisantes pour estimer l'importance réelle de ces mélanges génomiques. Un certain nombre de régions candidates d'origine hominidée a été retrouvé mais les preuves manquent pour affirmer une telle origine [20].

Le génome de référence et ses limitations pour l'analyse d'un génome individuel

Le projet de génome humain a permis de définir un génome de référence servant de standard à l'analyse d'autres génomes humains. Ce génome de référence n'est pas un génome individuel mais un mélange de quelques échantillons humains. Le génome de référence actuellement utilisé est dénommé GRCh37/hg19 (date de mise en application 2009 – Site UCSC/University of California Santa Cruz). Il n'est donc pas vraiment représentatif de la diversité humaine (sept milliards d'individus). Par ailleurs, il n'est pas non plus complet [23,24]. Un groupe d'experts, le Genome Reference Consortium (GRC) a été créé dans le but d'établir le génome de référence par excellence. Ce groupe réunit plusieurs instituts tels que le Genome Institute de l'université de Washington, le Wellcome Trust Sanger Institute et le European Bioinformatics Institute et le National Center for Biotechnology Information [25]. La publication permanente de nouveaux variants (SNPs, délétions, insertions, variants structurels) démontre la difficulté de déterminer un génome de référence [26]. Avec la population actuelle, on estime que de nouvelles mutations se sont accumulées sur au moins 5000 générations et que le taux de mutation par génération varie entre un et 100 [27]. Pour certains, il est fort probable que tous les variants possibles soient représentés par la population actuelle. Le génome de référence actuel est donc incomplet. Des groupes de travail au sein de l'équipe du projet international 1000 génomes et du groupe de travail sur le génome de référence (Genome Reference Consortium) sont en train de développer un génome de référence plus complet et plus précis. Certaines équipes proposent d'établir des génomes humains de référence par famille ou sur la base d'allèles ancestraux communs [26]. Dans l'attente de la conclusion de ces travaux, il n'y a pas d'autre choix que le génome actuel qu'il faut utiliser avec précaution, le risque d'erreurs existant (faux négatifs ou faux positifs). Dans le cas d'analyse de certaines pathologies comme les cancers, le meilleur génome de référence est celui du patient lui-même (comparaison entre la tumeur analysée et le tissu normal).

Les analyses de ces génomes individuels démontrent le nombre colossal de variations au sein de l'espèce humaine et la nécessité d'en étudier un très grand nombre afin de mesurer cette diversité et d'établir un catalogue des variants fréquents, rares et pathologiques. Un des projets phares de ce début de ^{xxi}e siècle pour répondre à ces objectifs a été la création du projet 1000 génomes.

Le projet 1000 génomes

Ce projet international initié aux États-Unis en 2008 a pour objectif de caractériser plus de 95 % des variants du génome dont la fréquence allélique de l'allèle le moins représenté est supérieure ou égale à 1 % dans la population mondiale ($MAF \geq 1\%$; *MAF, minor allele frequency* – [28]). Au début du projet, il s'agissait d'analyser 1000 génomes individuels en couverture 2X (chaque génome est séquencé deux fois) ce qui représentait environ 6 Gb (gigabases) de données informatiques par personne. Cependant, l'évolution

rapide des technologies a fait évoluer le projet. Actuellement, l'objectif de ce consortium s'est élargi. L'analyse des génomes est passé à 4X de couverture pour le génome entier et 20X pour l'exome de 2500 individus ainsi qu'une couverture de 40X pour le génome entier de 500 personnes. Ainsi, en mars 2012, 250 000 fichiers (et 260 téraoctets de données) étaient disponibles pour la communauté des biologistes du monde entier. Cette monumentale base de données continue de croître : elle est donc en permanente évolution, le projet poursuivant son cours avec un élargissement continu du nombre de génomes étudiés [28]. Elle constitue un formidable outil pour tous les généticiens tant dans le domaine de la recherche que du diagnostic. Parmi les nombreuses informations que ce projet nous apporte (il est conseillé d'aller visiter leur site Internet), on peut citer le taux de nouvelles mutations (néo-mutation) à chaque génération dans les cellules germinales (spermatozoïdes chez l'homme et ovocytes chez la femme). Il est estimé à 10^{-8} /base par génération (chiffre pour les mutations « simple base »). Ce chiffre important signifie que notre génome est en constante évolution. En pratique, un grand nombre de ces néo-mutations ont rarement des répercussions sur le plan fonctionnel (mais, ce n'est pas toujours le cas). Autre information apportée par ce projet, le nombre de variants simple brin (SNP, *single nucleotide polymorphism*) est plus important chez les africains (en moyenne, 3,3 millions par individu) que dans les populations des autres continents (en moyenne, 2,9 millions chez les européens et 2,8 millions chez les extrêmes orientaux de Chine et du Japon). Au fur et mesure de la complétion de ce projet, on remarque que le nombre de SNPs répertoriés dans la population mondiale continue de croître (tous les SNPs n'ont pas encore été identifiés dans le monde à ce jour). Ce répertoire mondial de SNPs constitue une base de données essentielle pour la médecine génomique. Car, il permet de différencier les variants « sans intérêt » (non pathologiques) de ceux jouant un rôle dans diverses pathologies. Par exemple, les patients homozygotes pour l'allèle UGT1A1*28 présentent un risque élevé de toxicité hématologique lorsqu'ils sont traités par l'irinotécan dans les cancers métastatiques du côlon [29]. En Europe, 10 % de la population est homozygote alors qu'en Afrique, 25 % de la population est homozygote pour ce variant. Il est donc évident que la recherche de cet allèle est importante dans la population africaine pour éviter les risques hématologiques de l'irinotécan [11].

Le projet HapMap

Le projet HapMap a pour objectif d'étudier les haplotypes présents dans le génome humain. Un haplotype est un groupe de variants (SNPs) transmis en bloc (c'est-à-dire transmis ensemble). En connaissant ces blocs de SNPs transmis d'une génération à l'autre, on peut en choisir certains et identifier l'association éventuelle de ces variants avec un phénotype. En effet, de nombreux SNPs étant transmis ensemble (on dit qu'ils sont en déséquilibre de liaison), il n'est pas utile de tous les étudier pour l'analyse d'une association entre un événement donné et tous ces SNPs. L'information serait redondante et le temps d'analyse supplémentaire inutile, plusieurs SNPs en déséquilibre de

liaison portant la même information. Les SNPs choisis dans ces blocs parmi les nombreux présents sont appelés SNP étiquettes (SNP tags). Ces derniers seront choisis pour étudier une association entre eux par exemple et une susceptibilité à une maladie, à des facteurs environnementaux ou à des traitements. Ainsi, pour conclure qu'un SNP ou un haplotype est associé à un risque infectieux, il faudra que cet haplotype soit significativement plus fréquent dans la population à risque par rapport à la population témoin (non à risque). Ce projet est complémentaire du projet 1000 génomes.

La pathologie moléculaire

L'analyse des génomes humains tant normaux que pathologiques (par exemple, les cancers) nous montre à quel point l'architecture de celui-ci est complexe mais aussi fragile. Outre les mutations héréditaires, de nouvelles mutations peuvent apparaître au cours de la vie d'un individu (mutations somatiques) et les nombreux variants qui nous constituent peuvent devenir instables et favoriser les réarrangements de nos gènes ou de séquences génétiques plus ou moins longues. Ces variants peuvent induire de nombreuses maladies. Nous ne nous attarderons pas sur ce vaste domaine déjà évoqué dans cette revue et nous suggérons aux lecteurs de s'y reporter pour plus de détails [30]. Nous rappellerons succinctement quelques notions de base. Brièvement, on distingue dans les maladies constitutionnelles (héréditaires), les maladies monogéniques et les maladies polygéniques. Ces maladies sont la conséquence de variations pathologiques appelées mutations. Ces mutations gain ou perte de fonction sont de nature variable. Elles peuvent être ponctuelles (une base remplacée par une autre), conséquences de la délétion ou de l'insertion de quelques bases ou la conséquence de réarrangements d'un gène, d'un groupe de gène ou d'une région chromosomique (délétion, duplication, inversion, translocation) ou de variations structurales du génome dont certaines peuvent être pathologiques (variation du nombre de copies de gènes [duplication, triplication, délétion] ou de segments de gènes de taille comprise en moyenne entre 100 pb et 1 Kb). Les maladies monogéniques (dites mendéliennes) présentent quatre modes de transmission, autosomique dominant, autosomique récessif, lié à l'X, très rarement lié à l'Y. Il existe par ailleurs quelques cas particuliers : le groupe des maladies mitochondriales (l'ADN mitochondrial est transmis par la mère), les néo-mutations (mutations acquises dans les cellules germinales d'un des deux parents ou au stade zygotique) et le mosaïcisme (mélange de population normale et mutée apparu au stade zygote ou plus tard dans le développement : on parle alors de mutation somatique). La notion de consanguinité (lien de parenté entre le père et la mère) ne doit pas être oubliée. En effet, elle augmente le risque de maladie de transmission récessive. Il faut aussi se rappeler l'existence de gènes modificateurs dont le rôle dans l'expression de la maladie est souvent important ainsi que certaines maladies à transmission oligogénique (deux gènes au minimum sont mutés et induisent par cette association une maladie héréditaire). Pour mémoire, le catalogue des maladies monogéniques OMIM est libre d'accès sur internet.

Le cas particulier des néo-mutations

Il a été démontré qu'en moyenne 74 nouveaux variants ponctuels étaient observés dans les cellules germinales d'un individu, ce calcul ayant été fait sur la base d'un taux de mutation de $1,18 \cdot 10^{-8}$ /base [31]. D'autres néo-mutations à type de CNV (*copy number variations*) ou de mutations d'insertion et/ou délétions (indel) ont été décrites. Ainsi, les analyses ont démontrés que le taux d'indel était de $4,10^{-10}$ par base soit en moyenne trois nouvelles indel/génome/génération. Quant aux CNV dont la taille est supérieure à 100 kb, l'estimation actuelle de leur taux est de 1 pour 50 individus [31]. Bien entendu, il s'agit de moyenne et les analyses ont démontré une variabilité en fonction du sexe, de l'âge et de l'ethnicité des sujets. Ces néo-mutations peuvent être responsables de maladies sporadiques souvent dramatiques. Comme déjà indiqué, l'origine peut être une cellule germinale mais elle peut aussi survenir après la fécondation (zygote), au cours de la gamétogenèse ou à un stade du développement plus tardif (mosaïcisme), ce qui peut poser des problèmes notamment pour le conseil génétique [31]. Celles-ci joueraient aussi un rôle important dans les maladies polygéniques. Elles joueraient un rôle important dans un grand nombre de retards mentaux et dans la schizophrénie par exemple.

Les maladies polygéniques et multifactorielles sont le plus souvent des maladies dites « communes » (par exemple, hypertension, diabète, maladies cardiovasculaires) et résultent de nombreux facteurs dont des variants génétiques de susceptibilité favorisant (ou protégeant) contre telle ou telle pathologie. En général, les variants de susceptibilité participent chacun à un risque spécifique de manière limitée (le risque pris isolément quoique significatif sur le plan statistique est faible sur le plan biologique). C'est l'association de plusieurs facteurs contributifs qui aboutit à un risque réel en association avec d'autres facteurs non génétiques (épigénétique et/ou environnemental). Par ailleurs, des mutations somatiques (non héréditaires) sont acquises au cours de la vie et sont la conséquence soit d'erreurs de réparation de l'ADN suite à une agression extérieure (par exemple, les UV du soleil) ou soit une mutation stochastique (aléatoire au cours des mitoses) ou par interaction avec l'environnement (agent infectieux, toxique...). Enfin, les épimutations (méthylation des îlots CpG, variations des histones, remodelage de la chromatine, action des microARNs) jouent un rôle déterminant dans l'ensemble de ces pathologies.

Les ARN non codants en pathologie moléculaire

Les ARN non codants (ARNnc) sont représentés principalement par les microARNs, les piARNs et les longs ARNs non codants (lncARNs). Une série d'articles a été consacrée en grande partie à ces ARNs dans cette revue. Nous conseillons aux lecteurs de s'y rapporter pour plus de détails [32,33]. Le rôle des microARNs dans les cancers est important : selon les miARNs, ils agissent soient comme suppresseurs de tumeur soit comme oncogènes. Outre leur rôle dans la physiopathologie des cancers, les ARNnc jouent un rôle important dans la physiopathologie de nombreuses maladies (maladies neurologiques, cardiovasculaires, héréditaires) [34]. Les miARNs

peuvent ne plus s'exprimer soit par anomalie épigénétique de leur promoteur, soit par mutation sur leur gène ou par d'autres altérations génétiques modifiant leur maturation notamment sur des protéines interagissant avec ces derniers (par exemple, la protéine DICER). La cible des ARNs non codants peut aussi être mutée et empêcher ainsi ces derniers d'agir [35]. Les piARNs par des mécanismes similaires peuvent aussi être altérés même si leur rôle dans les cancers est moins clair. Quant aux lncARNs, soit par des altérations similaires à celles observées pour les miARNs soit par interaction avec des miARNs, ils peuvent dans certains cas jouer un rôle important dans certains cancers.

L'épigénome

Le génome humain est donc constitué d'une longue séquence nucléotidique constituée des quatre bases A (adénine), C (cytosine), G (guanine) et T (thymine). Cependant, l'analyse de ce dernier n'est pas suffisante pour évaluer les conséquences pathologiques au niveau moléculaire. En effet, l'environnement, les événements stochastiques, les erreurs de la machinerie cellulaire aboutissent aussi à des modifications de la régulation de l'expression des gènes sans atteinte directe de la séquence du génome mais en agissant par des mécanismes régulant son expression. Ces derniers se passent au niveau de l'épigénome (étymologiquement « sur/autour du génome »). L'anomalie la plus souvent étudiée est l'analyse des modifications de méthylation sur l'ADN (la séquence est alors normale), les plus importantes étant la méthylation des cytosines dans les îlots CpG situés principalement au niveau des promoteurs de gène. Récemment, l'analyse des hydroxyméthylations a été ajoutée dans l'analyse de l'épigénome. Pour mémoire, on définit habituellement un îlot CpG par une séquence d'ADN de 500 pb contenant au moins 55 % de bases (G + C) et un rapport du nombre de CG observés par rapport à celui attendu supérieur à 0,6 [36]. Dans un grand nombre de cellules, ces îlots ne sont pas méthylés. Néanmoins, on les retrouve dans certains tissus (méthylations tissu-spécifique) alors que dans les régions intergéniques, on les retrouve habituellement méthylés. Ces méthylations quand elles existent sont associées le plus souvent à la répression de l'expression des gènes (*silencing*). Dans certains cas, leur rôle est physiologique par exemple dans le dosage de gène comme l'inactivation de l'X chez la femme (celle-ci étant XX, un seul des 2X est activé), l'expression mono-allélique dans l'empreinte parentale ou au cours de l'embryogenèse. Par ailleurs, une quantité importante d'îlots CpG méthylés se retrouvent au niveau de séquences répétées telles que les rétrotransposons (par exemple, les LINEs, *long interspersed elements*) ou les rétrovirus endogènes. Ces séquences répétées constituent environ 40 % du génome humain. La méthylation de celles-ci empêche leur expression, cette dernière quand elle a lieu, ayant des conséquences pathologiques au niveau de la stabilité tant des chromosomes que du génome en général [37]. Les modifications épigénétiques peuvent être transmissibles. Elles sont souvent acquises par interaction avec l'environnement. La modification de l'état de méthylation de ces îlots peut aboutir soit à l'abolition d'expression du gène (en général, par méthylation des cytosines comme déjà indiqué) soit par

l'expression de gènes réprimés (en abolissant cette méthylation). Ce phénomène est notamment vu dans les cancers. L'épigénome ne se résume pas à l'état de méthylation d'îlots CpG. D'autres mécanismes épigénétiques agissent aussi tels que les modifications d'histones, l'expression des microARNs et les différentes conformations de la chromatine. Ainsi, les propriétés évolutives de l'épigénome jouent un rôle majeur dans l'expression des gènes et donc en physiologie et en physiopathologie.

Les cinq composants majeurs de l'épigénome peuvent être ainsi résumés [38] :

- les méthylations de l'ADN ;
- les protéines liées à l'ADN et les modifications associées notamment sur les histones ;
- les ARNs non codants (rôle dans la répression de la chromatine, l'inactivation de l'X, l'empreinte génomique) ;
- l'accession à la chromatine. Celle-ci est liée à la présence de protéines modulant l'accession à la machinerie transcriptionnelle ;
- l'organisation spatiale de la chromatine. Il s'agit de son organisation en trois dimensions, modèle dynamique dont le rôle est majeur tant pour l'accessibilité de la chromatine que pour la méthylation et l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle et régulatrice de l'expression des gènes.

Contrairement au génome dont l'évolution chez un individu évolue peu en général avec l'âge (hormis les mutations somatiques), l'épigénome est hautement dynamique et évolue dans le temps en interaction avec l'environnement. Un groupe international s'est donc constitué pour cartographier l'état de méthylation du génome (Human Epigenome Project) ainsi que les modifications des histones et de la chromatine (Epigenomics project). Ces projets permettent l'élaboration progressive d'un atlas de l'épigénome humain, l'Epigenome Atlas accessible librement sur internet. Par ailleurs, des études à grande échelle d'association entre pathologies et modifications épigénétiques commencent à être envisagées (études dénommées EWAS, Epigenome Wide Association Studies). On ignore en effet actuellement de manière précise l'importance de ces variations tant physiologiques (épimorphismes) que pathologiques (épimutations). Sur le plan pathologique, les modifications de méthylation ont été particulièrement étudiées dans les cancers où leur rôle est majeur dans la physiopathologie. Par exemple, on a pu démontrer que les vrais jumeaux (« clones » naturels dont le patrimoine génomique et épigénomique est identique à 100 % à la naissance) ne possèdent plus le même patrimoine épigénétique au cours de leur vieillissement par suite des interactions avec l'environnement [39].

Le variome

Nous avons évoqués dans les paragraphes précédents les polymorphismes génétiques et épigénétiques. Pour rappel, il s'agit de variants de fréquence supérieure à 1 % par convention et qui n'induisent pas de pathologie. Dans le cadre des polymorphismes génétiques, il peut s'agir de variants ponctuels (SNPs,) ou de variants de nature différente

(délétions, insertions, variations structurales). Un grand nombre de polymorphismes sont neutres (sans conséquence sur l'activité d'une protéine ou la fonction d'un gène) mais d'autres peuvent moduler les propriétés d'une protéine ou d'un gène : on parle alors de polymorphisme fonctionnel. Ces variants neutres ou non participent à notre phénotype (ce que nous sommes) sans être pathologiques et sont variables d'un groupe ethnique à l'autre [40]. Cette diversité tant au niveau génomique qu'épigénomique s'appelle le variome. Il ne s'agit pas de mutations mais bien de polymorphismes. La base de données 1000 génome par exemple rapporte ces variants.

Les études d'association tout génome ou GWAS (Genome Wide Association Studies)

Notion d'héritabilité

L'héritabilité est un terme statistique se définissant comme la proportion de la variance phénotypique globale (par exemple, caractère physique, pathologie) attribuée à des facteurs génétiques additifs [41]. La notion de facteurs génétiques additifs est importante. En effet, le calcul de l'héritabilité est fait en considérant qu'il n'existe pas d'interactions entre les différents allèles mais que leurs effets sont additifs. Or, les interactions génétiques affectent ce calcul. L'héritabilité est de plus en plus utilisée dans l'analyse des gènes de susceptibilité impliqués tant en physiologie (par exemple, taille d'un individu) que dans l'étude des maladies. Elle est en partie dépendante des facteurs environnementaux et de la population étudiée (pris en compte dans le calcul de la variance phénotypique). Comme évoqué ci-dessus, ce calcul tient compte des effets additifs de l'environnement et des facteurs génétiques mais ne tient pas compte de l'interaction des gènes entre eux (appelée aussi épistasie [42]) et des effets de l'environnement (effets interactifs de l'environnement). Enfin, comme tout calcul statistique, l'héritabilité est calculée sur une population et non sur un individu. Il s'agit donc d'une notion relative dont il faut avoir une vision critique lors de toute interprétation d'un génotype chez un individu ou un groupe [43].

Les études d'association à grande échelle

Les études d'association analysent un grand nombre de SNPs (de plusieurs milliers à millions) répartis dans l'ensemble du génome humain afin d'identifier des régions ou des marqueurs génétiques contribuant à une maladie ou à un groupe de maladie en comparant une population témoin non malade et une population malade, les deux populations étant comparable en tout point (sauf bien évidemment pour la pathologie étudiée). Dans ce genre d'analyse, on considère que les marqueurs statistiquement associés à la maladie étudiée sont soit directement impliqués dans la pathologie soit proche du gène ou du locus impliqué dans celle-ci. Cette stratégie a été utilisée avec succès dans un certain nombre de maladies. Elle reste cependant lourde à entreprendre (plusieurs milliers de patients et contrôles, nécessité d'une grande puissance statistique, coût) et difficile à analyser en cas de grande hétérogénéité de la maladie causale. Les

pathologies les plus courantes (diabète, cancers, maladies cardiovasculaires...) sont la conséquence de nombreuses interactions environnementales mais aussi génétiques. Afin d'identifier les variants de cause ou de susceptibilité de ces maladies improprement dénommées communes, de nombreuses et importantes études d'association entre des marqueurs génétiques sur le génome et différentes pathologies ont été réalisées. Par exemple, une étude majeure rapportée en 2007 par le consortium privé Wellcome a identifié 24 régions associées de manière très significative à sept phénotypes pathologiques (maladies) dont le diabète de type 2, l'hypertension et la polyarthrite rhumatoïde [44]. Dans la recto-colite hémorragique, une étude a identifié 47 locus impliqués [45]. Néanmoins, le risque relatif significatif est très souvent faible, dans la majorité des cas entre 1,1 et 1,5. En pratique, cela signifie que, si on considère qu'un sujet ne présente pas de risque pour un allèle A par exemple, son facteur de risque est égale à 1. Si un autre sujet pour le même gène présente un allèle B avec un risque de 1,1, cela signifie que son risque avec cet allèle (B) de développer une maladie est multiplié par 1,1 (au lieu de 1 qui veut dire aucun risque particulier pour l'allèle A : l'allèle B représente 10% de risque en plus par rapport à l'allèle A). On voit donc la faiblesse de ce risque B par rapport au « non-risque » A. Malgré l'importante quantité d'études GWAS (voir la base de données GWAS central et le catalogue des études, www.genome.gov/26525384), ces dernières ont montré que la part héritable de nombreuses maladies multifactorielles et polygéniques était faible. (C'est-à-dire la partie de la pathologie qui s'explique par les variants présents dans les gènes) Elle varie selon les pathologies. Par exemple, bien qu'on pense que la part héritable de l'obésité se situerait entre 40 et 70%, les grandes études réalisées à ce jour (et une douzaine d'entre elles sont considérées comme de très grande qualité, c'est-à-dire robustes), la part héritable retrouvée n'est que de 2%. Certains ont parlé de l'héritabilité manquante non retrouvée par ces études [43]. Néanmoins, un grand nombre de ces études présentent des biais de stratification (certains sous-groupes sont sous/non représentés par exemple, des groupes d'origine africaine), ce qui pose des problèmes d'interprétation et de risque de sous-évaluation des résultats [11]. D'ailleurs, la grande diversité de distribution des variants d'une population ou d'une ethnie à l'autre pose la question de la validité de ce genre d'études réalisée dans une population définie pour une autre population ou ethnie non étudiée dans l'étude. Il est donc fort probable que ces études passent à côté d'un grand nombre de facteurs héréditaires. Parmi les raisons expliquant le manque probable de puissance de ces analyses, on peut citer l'existence de variants rares ayant des effets importants (variants de fréquence < 1%), des associations avec des variants non encore identifiés, des problèmes d'ajustement statistique (liée aux structures des populations et aux mélanges ethniques notamment), la taille insuffisante des effectifs analysés, des variations non génétiques mais épigénétiques, des modèles statistiques inappropriés, l'absence/insuffisance de prise en compte de l'épistasie (c'est-à-dire l'interaction entre les gènes), les méthodes statistiques les incluant nécessitant un perfectionnement méthodologique. Ce dernier phénomène peut aussi être repris pour l'interaction entre les variants. Par ailleurs, comme brièvement évoqué

ci-dessus, les variations épigénétiques ne sont pas étudiées. Les marqueurs épigénétiques tels que l'analyse de méthylation et les variants biochimiques d'histones jouent un rôle majeur dans l'expression des gènes. On sait par exemple qu'il existe des zones de méthylation différentielle sur le génome (DMR, *DNA methylated regions*), des méthylations tissu-spécifique et des variations inter-individuelles (épimorphismes). Ces méthylations évoluent d'ailleurs selon le contexte environnemental, l'âge et le sexe. Le défi des analyses d'association tout génome est donc majeur et encore insuffisamment résolu sur le plan méthodologique.

Le microbiome, groupe de génomes saprophytes chez l'être humain

Notre organisme vit en symbiose avec le milieu extérieur et son milieu intérieur constitués entre autres d'un grand nombre d'agents microbiens. Notre peau, notre tube digestif et notre appareil urogénital sont en contact permanent avec un nombre considérable d'agents microbiens saprophytes. On estime que le nombre d'agents microbiens dans/sur notre corps est au minimum dix fois supérieur à la quantité de cellules dont nous sommes constitués. Ces saprophytes jouent un rôle majeur dans notre physiologie tant sur le plan métabolique qu'immunitaire. Afin d'étudier les multiples rôles de ces saprophytes, en 2007 le projet Human Microbiome Project a été lancé [46]. Son objectif est de comprendre non seulement le rôle physiologique de ce supra-génome mais aussi d'étudier des prédispositions aux maladies liées aux déséquilibres de cette flore saprophyte. Par exemple, des études chez la souris ont permis de démontrer le rôle de cette flore dans l'obésité. Ainsi, lorsqu'on transfère le microbiome de souris génétiquement obèses (*ob/ob*) qui possèdent une mutation dans le gène de la leptine à une souris dont le tube digestif ne contient pas de bactéries, la quantité de tissu adipeux de cette dernière augmente. Cette augmentation est significativement plus augmentée que si on y transfère le microbiome d'une souris mince [46]. Une des hypothèses avancées est que le microbiome de la souris obèse recueille l'énergie globale des aliments et la transfère de manière plus efficace. Ainsi, dans la recherche contre l'obésité, l'analyse du microbiome est-elle fondamentale.

Les bases de données d'expression des gènes

Afin de comprendre l'interaction des gènes entre eux et des conséquences tant physiologiques que physiopathologiques sur notre organisme, outre les analyses de génomes et d'épigénomes, l'analyse de l'expression des gènes à grande échelle a été réalisée sur de nombreux tissus tant à l'état normal que pathologique. Il s'agit dans ce cas là essentiellement de l'expression des ARN messagers (issus des gènes codants) et des ARNs non codants (essentiellement les microARNs). Les informations sont disponibles pour des tissus sains (foie, cerveau...) et des tissus malades (cancers par exemple). Par exemple, en allant sur le site d'accès libre GEO (*Gene Expression Omnibus*), en tapant (en anglais) cancer du sein, un chercheur peut retrouver 1170 expériences représentant environ 33 000 échantillons et une grande quantité de données d'expression de gènes

[47]. Depuis 2002, la majorité des journaux dans lesquels sont publiées les études d'expression de gènes imposent le dépôt des analyses d'expression dans ces bases de données comme GEO (maintenu aux États-Unis par le centre NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) ou ArrayExpress et Gene Expression Atlas, bases de données européennes maintenues à l'Institut Européen de Bioinformatique, EBI (*European Bioinformatics Institute*). Ces gigantesques bases de données d'expression de gènes constituent une mine d'informations considérable sur un grand nombre de pathologies et servent aux nombreux chercheurs tant pour l'analyse physiopathologique que pour la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques par exemple dans les cancers. Ainsi, dans de nombreux laboratoires de recherche, la première étape est-elle l'analyse des données validées et disponibles dans de vastes bases de données comme celle-ci. Dans un second temps, après avoir émis des hypothèses, les analyses de laboratoire permettront de les tester. Bien entendu, ces nombreuses analyses présentent toutes des biais et doivent être étudiées avec un certain sens critique. Néanmoins, de nombreux chercheurs estiment que la quantité importante de données issues de ces différentes analyses devrait minimiser ces biais. Actuellement, il semblerait que seulement environ 20 % des chercheurs utilisent ces bases de données, ce chiffre paraissant cependant sous-estimé [47]. Il s'agirait semble-t-il d'un problème culturel, les chercheurs étant souvent réticents à utiliser des données dans des formats différents de ceux dont ils ont l'usage habituel. Les résultats de certaines analyses récentes démontrent cependant l'intérêt majeur de ces bases de données [48].

Le séquençage à l'aide des techniques dites de nouvelle génération aujourd'hui en médecine – Vue générale

Le séquençage de nouvelle génération introduit en 2005 regroupe un ensemble de techniques de séquençage différentes du séquençage selon la méthode de Sanger, technique habituellement utilisée en routine dans le séquençage par exemple en milieu hospitalier en génétique moléculaire. Schématiquement, ces technologies permettent le séquençage en parallèle et à grande échelle de molécules d'ADN amplifiées clonalement soit une molécule unique d'ADN est amplifiée et chaque molécule est amplifiée en parallèle (PCR émulsion) soit un groupe de molécules d'ADN sont isolées spatialement puis amplifiées individuellement (par exemple, PCR en pont). Selon l'instrument et la stratégie d'analyse, il est possible d'étudier un génome entier (séquençage tout génome), un exome (voir infra) ou certaines cibles choisies (par exemple, un groupe de gènes responsable de la même maladie). À ce jour, en milieu hospitalier ou de recherche clinique, le séquençage ciblé ou le séquençage d'exome sont les plus utilisés [49].

La notion d'exome

L'exome est constitué de l'ensemble des séquences codantes des gènes codant pour des protéines (environ 23 000 gènes), ce qui constitue environ 1 à 1,5 % du génome

Proportion de l'exome (gènes codants) dans le génome humain

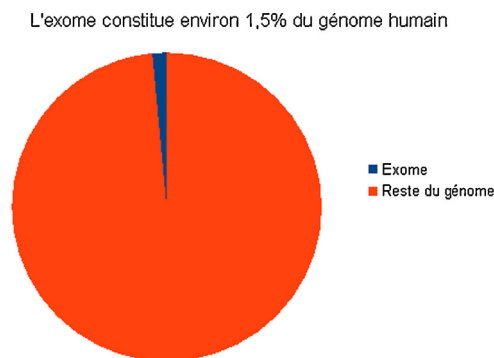


Figure 1 L'analyse d'exome constitue l'analyse des exons et jonctions exons/introns des gènes codant dans le génome humain (dans certains cas, les régions 3' et 5' non codantes y sont ajoutées). Elle représente environ 1,5 % du génome humain. L'analyse d'exome a permis de découvrir de nouveaux gènes mutés notamment dans des maladies héréditaires ou dans des cancers. Cette analyse constitue cependant fort probablement une étape intermédiaire avant l'analyse du génome entier tant que le prix de l'analyse d'un génome entier sera élevé par rapport à celui d'un exome.

total (Fig. 1) soit environ 30 Mb. En général, pour étudier cet exome, des méthodes de captures d'exons en milieu liquide ou solide sont utilisées [8]. La première étude rapportant cette analyse par capture date de 2009 [50]. Cette analyse a actuellement un succès important dans le diagnostic des maladies rares. En effet, il est moins coûteux que le séquençage tout génome et la quantité d'information à analyser et à filtrer est beaucoup moins importante. La diminution rapide du coût du séquençage tout génome dont le prix se rapproche de celui de l'exome amène un nombre de plus en plus important d'équipes à changer de stratégie. Une discussion dans le monde de la génétique sur le choix des stratégies entre exome et tout génome est toujours en cours d'autant plus qu'en analysant au plus 1,5 % du génome, 98,5 % n'est pas analysé ! Pour les maladies mendéliennes (monogéniques), conséquence le plus souvent de l'atteinte d'un seul gène, de nombreux succès ont été obtenus et de nouveaux gènes identifiés. Néanmoins, cette approche est plus intéressante pour les maladies de transmission récessive et homogène sur le plan génétique avec une forte pénétrance. Même si des succès ont été atteints pour des maladies autosomiques, le taux d'échec reste non négligeable d'autant plus que certaines maladies de transmission mendélienne sont hétérogènes.

Le séquençage tout génome

Bien que l'exome analyse les parties codantes des gènes, un certain nombre de maladies sont la conséquence d'anomalies dans les régions non codantes telles que des régions régulatrices, des gènes de microARN (ou d'autres ARN non codants), des variations structurelles du génome. Ces anomalies ne seront pas observées par l'analyse de l'exome. Un grand nombre d'études ont permis de découvrir de nouveaux gènes responsables de maladies héréditaires ou

Tableau 2 Comparaison des avantages et inconvénients de l'exome et du séquençage tout génome.

	Séquençage tout génome	Exome
Coût	+++ (diminution constante : < 1000 euros en décembre 2012 ?)	Environ 850 euros
Technique	Pas de capture	Capture d'exome (souvent incomplète)
	Deuxième génération : PCR indispensable	Couverture d'exome inégale
	Troisième génération : analyse directe de l'ADN sans amplification	Analyse des exons, des jonctions exon/intron, des parties 3 et 5' non codantes
	Environ 3–4 millions de variants	Environ 20 000 variants
Indications	Maladies mendéliennes	Maladies mendéliennes avec pénétrance importante
	Maladies polygéniques	Cancers
	Cancers	Épidémiologie génétique
	Analyse de variants structurels	

impliqués dans les cancers par exemple [8]. Dans certains cas, outre la mise en évidence du/des gène(s) responsable(s), les auteurs ont pu analyser d'autres portions du génome non directement impliquées dans la pathologie et identifier des facteurs de susceptibilité thérapeutiques et par conséquent optimiser le traitement du patient. L'apport du séquençage tout génome à la pharmacogénomique ou à la cancérologie par exemple est primordial [51].

L'approche actuelle de l'analyse d'exome est discutée dans la communauté et il est fort probable qu'il s'agisse d'une étape technologique intermédiaire dans l'analyse du génome tant en recherche qu'en diagnostic en attendant la baisse des coûts des machines et des réactifs. L'évolution des prix, des outils bioinformatiques et l'arrivée prochaine des séquenceurs de troisième génération amènent à penser que l'approche systématique tout génome sera bientôt la stratégie de base de toute analyse génomique [52].

Nous reviendrons plus en détail non seulement sur les différents types d'analyse dans le prochain chapitre mais aussi sur les approches stratégiques actuelles et à venir (Tableau 2).

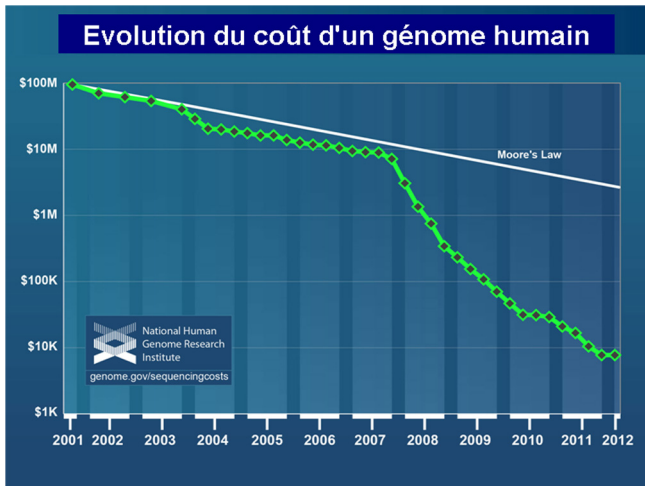


Figure 2 Évolution du coût d'un génome (référence : National Human Genome Research Institute – NHGRI). Le prix du séquençage d'un génome humain a considérablement diminué et continue de décroître à un rythme rapide.

La biologie des systèmes

L'objectif de la biologie des systèmes consiste à intégrer l'ensemble des données biologiques dans une représentation qualitative et quantitative globale permettant une vision d'un système dans son intégralité [53]. Elle constitue un ensemble de réseaux biologiques constitués de modules. En effet, une vision plus globale d'un système toujours complexe nécessite une vision plus large et plus dynamique qu'un système figé tel que nous l'analysons le plus souvent. La mise en réseau des différentes relations inter-biologiques permet une approche différente et plus dynamique de la biologie. En analysant des perturbations dans tel ou tel sous-réseau (en partant d'hypothèses ou de résultats d'études de laboratoire), on peut analyser le comportement de l'ensemble et en déduire des actions (par exemple, trouver une nouvelle voie thérapeutique, de nouveaux marqueurs biologiques, établir un modèle physiopathologique ou comprendre un dysfonctionnement biologique). En pratique, de nombreuses simulations peuvent être créées. Ces réseaux peuvent être construits à partir de données statistiques issues d'études d'expression par exemple et/ou à partir de la construction de modèles mathématiques déduits d'interactions biologiques connues [54]. Elle associe des données de la génomique et de la protéomique. Bien que récente dans le domaine de la biologie, cette nouvelle approche de l'analyse des maladies et de la physiologie normale se met en place. Son importance dans le domaine de la médecine génomique est indiscutable. Néanmoins, il s'agit d'un défi majeur tant la complexité des systèmes biologiques est grande [55,56].

La médecine génomique personnalisée

La notion de médecine personnalisée est aussi vieille que la médecine elle-même. Hippocrate et de nombreux autres après lui soulignaient l'importance de traiter le patient et non la maladie. La description des génomes humains a

Tableau 3 Bases de données sur Internet (exemples).

	Adresse Internet
<i>Bases de données et sites pour l'étude des génomes</i>	
Ensembl	www.ensembl.org/index.html
Complete Genomics	www.completegenomics.com/public-data
Génome de référence (site UCSC)	genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway
Genome reference consortium	www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/
Base de données de pseudogènes	pseudogene.org
Base de données de miARNs	www.mirbase.org
Base de données de lncARNs	www.lncrnadb.org
Base de données de piARNs	pirnabank.ibab.ac.in
<i>Base de données de polymorphismes</i>	
dbSNP	www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
Exome variant server	evs.gs.washington.edu/EVS/
<i>Base de données de facteurs de transcription</i>	
ITFP (Integrated Transcription Factor Platform)	itfp.biosino.org/itfp/
<i>Projets de séquençage de génomes humains individuels</i>	
Projet 1000 genomes	www.1000genomes.org
Personal Genome Project	www.personalgenomes.org
<i>Base de données d'études d'association tout génome (GWAS)</i>	
GWAS central	www.gwascentral.org
Catalogue des études GWAS de la littérature mondiale (National Human Genome Research Institute, USA)	www.genome.gov/26525384
<i>Étude du microbiome humain</i>	
Projet microbiome humain—Human Microbiome Project (HMP)	commonfund.nih.gov/hmp
International Human microbiome consortium	www.human-microbiome.org
<i>Bases de données de mutations</i>	
HMGD (Human Genes Mutations Database)	www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
HGVS data bases (Human Genome Variation Society)	www.hgvs.org/dblist/dblist.html
Projet HapMap	hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
Human Heredity and Health in Africa	www.h3africa.org/about.cfm
MITOMAP (human mitochondrial genome database)	www.mitomap.org/MITOMAP
DGV (Data of genomic variants)	projects.tcag.ca/variation
DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)	decipher.sanger.ac.uk
Copy Number Variation (CNV) Project	www.sanger.ac.uk/research/areas/humangenetics/cnv
ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations)	umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp
Annuaire de bases de données de variants structurels du génome	www.hgvs.org/dblist/chromo.html
<i>Encyclopédie des maladies héréditaires monogéniques</i>	
OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)	www.omim.org
<i>Bases de données sur les génomes de cancers</i>	
Cancer Genome Atlas (TCGA)	cancergenome.nih.gov
International Cancer Genome Consortium (ICGC)	www.icgc.org
Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC)	www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic
<i>Groupe d'études de l'épigénome humain</i>	
	www.epigenome.org
	www.roadmapepigenomics.org
Atlas de l'épigénome	www.genboree.org/epigenomeatlas/index.rhtml
<i>Expression de gènes</i>	
GEO (Gene Expression Omnibus)	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
ArrayExpress	www.ebi.ac.uk/arrayexpress
Gene Expression Atlas	www.ebi.ac.uk/gxa

Tableau 3 (Suite)

	Adresse Internet
Base de donnée de la biologie des systèmes	
Annuaire de la biologie des systèmes	csbdb.mpimp-golm.mpg.de
Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures (LINCS)	www.biochemweb.org/systems.shtml
Connectivity Map (CMAP)	commonfund.nih.gov/lincs
Human Protein Reference Database (HPRD)	www.broadinstitute.org/LINCS
	www.broadinstitute.org/cmap
	www.hprd.org

bouleversé ce concept. Nous entrons dans une nouvelle ère (encore embryonnaire), la médecine génomique. À ce jour, il est probable que plus de 30 000 génomes individuels aient été séquencés [57]. Par ailleurs, le coût du séquençage d'un génome humain sera prochainement inférieur à 1000 dollars (au plus tard dans deux ans – Fig. 2). Les nombreuses bases de données libres d'accès (Tableau 3) permettent d'obtenir de précieuses informations sur de nombreuses pathologies et variants normaux non pathologiques. Comme déjà évoqué au début de cet article, plusieurs applications sont désormais possibles. Il peut s'agir d'analyser un génome ou une partie d'un génome (exome ou groupe ciblé de gènes) pour un patient dans le cas d'une pathologie mais il peut aussi s'agir d'un génome à la demande chez un sujet a priori sain et qui volontairement paye pour avoir son génome couramment appelé génomique à la demande (chez les anglo-saxons, DTC, *direct to consumer genomics*). Bien qu'elle n'existe pas à ce jour en France (où un vide juridique existe à ce sujet), de nombreuses sociétés en Europe (cf. Espagne, Royaume Uni ou Belgique) et aux États-Unis proposent de tels services (au moins 40 compagnies dans le monde sont actuellement recensées). Bien entendu, outre les problèmes d'interprétation de ces données, ce marché privé soulève des problèmes éthiques et juridiques. Par ailleurs, un projet public de séquençage de génome individuel a aussi pris jour en 2006, le Personal Genome Project (PGP). Il a pour but de séquencer des génomes de volontaires (sains ou non) et de rendre publique les résultats obtenus (ainsi que le phénotype des individus). À ce jour, environ 1800 volontaires ont été enregistrés [58].

Actuellement, en recherche clinique ou non, plusieurs approches d'analyse génomique sont possibles :

- le séquençage de sujets normaux (médecine préventive). C'est la génomique à la demande ;
- le séquençage du génome fœtal chez la mère (diagnostic prénatal) ;
- le séquençage des tumeurs afin d'établir un diagnostic, un pronostic et d'optimiser les cibles thérapeutiques ;
- le diagnostic des maladies héréditaires ;
- l'adaptation thérapeutique en fonction du fond génomique (pharmacogénomique).

Avec cette première partie, nous avons voulu montré au lecteur sans pour autant être exhaustif, la dynamique de la recherche actuelle, des connaissances de la génétique humaine et de ses implications progressives dans différents domaines de la médecine. Nous sommes à une période

charnière en médecine et la génétique humaine y contribue de manière considérable.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, Helbling D, Bonacci BB, Decker B, et al. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med* 2011;13(3):255–62.
- [2] Welch JS, Westervelt P, Ding L, Larson DE, Klc JM, Kulkarni S, et al. Use of whole-genome sequencing to diagnose a cryptic fusion oncogene. *JAMA* 2011;305(15):1577–84.
- [3] Ashley EA, Butte AJ, Wheeler MT, Chen R, Klein TE, Dewey FE, et al. Clinical assessment incorporating a personal genome. *Lancet* 2010;375(9725):1525–35.
- [4] Köser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med* 2012;366:2267–75.
- [5] International human genome sequencing consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860–921.
- [6] International human genome sequencing consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931–45.
- [7] Li W. On parameters of the human genome. *J Theor Biol* 2011;288:92–104.
- [8] Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med* 2012;63:35–61.
- [9] Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 2007;5:e254.
- [10] Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 2008;452:872–6.
- [11] Ramsay M. Africa: continent of genome contrasts with implications for biomedical research and health. *FEBS Letters* 2012;586:2813–9.
- [12] Behar DM, Vilems R, Soodyall H, Blue-Smith J, Pereira L, Metspalu E, et al. The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet* 2008;82:1130–40.
- [13] Schuster SC, Miller W, Ratan A, Tomsho LP, Giardine B, Kasson LR, et al. Complete Khoisan and Bantu genomes from southern Africa. *Nature* 2010;463:943–7.

- [14] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008;456:53–9.
- [15] Wang J, Wang W, Li R, Li Y, Tian G, Goodman L, et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature* 2008;456:60–5.
- [16] Kim JI, Ju YS, Park H, Kim S, Lee S, Yi JH, et al. A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual. *Nature* 2009;460:1011–5.
- [17] Ahn SM, Kim TH, Lee S, Kim D, Ghang H, Kim DS, et al. The first Korean genome sequence and analysis: full genome sequencing for a socio-ethnic group. *Genome Res* 2009;19:1622–9.
- [18] Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, et al. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 2006;444:330–6.
- [19] Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, et al. Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 2006;314:1113–8.
- [20] Alves I, Srámková Hanulová A, Foll M, Excoffier L. Genomic data reveal a complex making of humans. *PLoS Genet* 2012;8:e1002837.
- [21] Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 2010;328:710–22.
- [22] Reich D, Patterson N, Kircher M, Delfin F, Nandineni MR, Pugach I, et al. Denisova admixture and the first modern human dispersals into Southeast Asia and Oceania. *Am J Hum Genet* 2011;89:516–28.
- [23] Kidd JM, Samps N, Antonacci F, Graves T, Fulton R, Hayden HS, et al. Characterization of missing human genome sequences and copy-number polymorphic insertions. *Nat Methods* 2010;7:365–71.
- [24] Li R, Li Y, Zheng H, Luo R, Zhu H, Li Q, et al. Building the sequence map of the human pan-genome. *Nat Biotechnol* 2010;28:57–63.
- [25] Church DM, Schneider VA, Graves T, Auger K, Cunningham F, Bouk N, et al. Modernizing reference genome assemblies. *PLoS Biol* 2011;9:e1001091.
- [26] Rosenfeld JA, Mason CE, Smith TM. Limitations of the human reference genome for personalized genomics. *PLoS One* 2012;7:e40294.
- [27] Aach J, Bullyk ML, Church GM, Comander J, Derti A, Shendure J. Computational comparison of two draft sequences of the human genome. *Nature* 2001;409:856–9.
- [28] Clarke L, Zheng-Bradley X, Smith R, Kulesha E, Xiao C, Toneva I, et al. The 1000 Genomes Project: data management and community access. *Nat Methods* 2012;9:459–62.
- [29] Côté JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Die MD, Soubeyran I, et al. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res* 2007;13:3269–75.
- [30] Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Notions de génétique moléculaire pour comprendre l'hérédité. *IBS* 2008;23:331–52.
- [31] Veltman JA, Bunner HG. De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 2012;13:565–75.
- [32] Lamoril J, Bouizegarène P, Bogard P. Le monde complexe et mouvant des ARN. Seconde partie: les microARNs. *Immuno Analyse Biol Spec* 2010;25:219–40.
- [33] Lamoril J, Bouizegarène P, Bogard P. Le monde complexe et mouvant des ARN. Troisième partie. *Immuno Analyse Biol Spec* 2011;26:225–38.
- [34] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861–74.
- [35] Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011;43:242–5.
- [36] Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3740–5.
- [37] Florea C, Schenkenburger M, Grandjeanette C, Dicato M, Diederich M. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* 2011;3:581–609.
- [38] Milosavljevic A. Emerging patterns of epigenomic variation. *Trends Genet* 2011;27:242–50.
- [39] Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* 2010;20:170–9.
- [40] Choy M, Movassagh M, Foo R. The human variome: genomic and epigenomic diversity. *EMBO Mol Med* 2011;3:573–4.
- [41] Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era-concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet* 2008;9:255–66.
- [42] Lehner B. Molecular mechanisms of epistasis within and between genes. *Trends Genet* 2011;27:323–31.
- [43] Marian AJ. Elements of "missing heritability". *Curr Opin Cardiol* 2012;27:197–201.
- [44] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–78.
- [45] Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* 2011;43:246–52.
- [46] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804–10.
- [47] Baker M. Gene data to hit milestone. *Nature* 2012;487:282–3.
- [48] Kodama K, Horikoshi M, Toda K, Yamada S, Hara K, Irie J, et al. Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7049–54.
- [49] Neveling K, Collin RW, Gilissen C, van Huet RA, Visser L, Kwint MP, et al. Next generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat* 2012;33:963–72.
- [50] Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009;461:272–6.
- [51] Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011;364:1144–53.
- [52] Shendure J. Next-generation human genetics. *Genome Biology* 2011;12:408–10.
- [53] Nielsen J, Lee SY. Systems biology: the new biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:583–4.
- [54] Ghosh S, Matsuoka Y, Asai Y, Hsin KY, Kitano H. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nat Rev Genet* 2011;12:821–32.
- [55] Antony PM, Balling R, Vlassis N. From systems biology to systems biomedicine. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:604–8.
- [56] Ram PT, Mendelsohn J, Mills GB. Bioinformatics and systems biology. *Mol Oncol* 2012;6:147–54.
- [57] Meyer UA. Personalized medicine: a personal view. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:373–5.
- [58] Ball MP, Thakuria JV, Zaranek AW, Clegg T, Rosenbaum AM, Wu X, et al. A public resource facilitating clinical use of genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:11920–7.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Les réactions d'hypersensibilité aux médicaments courants de l'enfant : conduite diagnostique

Hypersensitivity reactions to commonly used drugs and biological substances in children: Diagnostic algorithm

C. Ponvert

Service de pneumologie et allergologie, hôpital Necker–Enfants-Malades, département de pédiatrie, université Paris-Descartes, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Reçu le 17 octobre 2012 ; accepté le 30 décembre 2012

KEYWORDS

Child;
Drug allergy;
In vitro tests;
Provocation tests;
Skin tests

Summary Suspected allergic reactions to drugs and biological substances (anti-infectious drugs and antipyretics, non-opioid analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs especially) are reported in 5 to 12% of children. Most frequent reactions are morbilliform/maculopapular rashes, urticaria and angioedema. Other cutaneous and respiratory reactions, and severe allergic and non-allergic anaphylactic reactions are rare. The results of studies based on allergological tests and/or microbiological/serological tests strongly suggest that, except for a few types of reactions (anaphylactic and/or immediate reactions, potentially harmful toxidermias) and for very specific drugs (i.e. latex and myorelaxants), most reactions do not result from drug hypersensitivity, but are rather a consequence of the infectious and/or inflammatory diseases for which the drugs have been prescribed. Non-immediate reactions may also result from complex interactions between drugs, immune system and "danger signals" provided or induced by infectious and/or inflammatory diseases. Diagnosis is based above all on a detailed analysis of clinical history, skin tests (if validated), and challenge tests (if indicated). At present, except in a few cases, the diagnostic and predictive values of in vitro tests exploring immediate and non-immediate-type of drug hypersensitivity are not validated.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Allergie
médicamenteuse ;
Enfant ;
Tests cutanés ;
Tests de provocation/

Résumé Des réactions présumées allergiques à un ou plusieurs médicaments ou substances biologiques (antibiotiques et antipyrétiques, antalgiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens, notamment) sont rapportées chez 5 à 12 % des enfants. Les réactions les plus fréquentes sont les éruptions maculopapuleuses et mal étiquetées, et les urticaires et angio-œdèmes. Les autres réactions, cutanées et respiratoires, et les réactions anaphylactiques graves sont rares, sinon exceptionnelles. Les résultats des études ayant comporté des bilans allergologiques et des examens microbiologiques et/ou sérologiques suggèrent fortement que, sauf pour certains types

Adresse e-mail : claud.ponvert@nck.aphp.fr

réintroduction ; Tests in vitro

de réactions (réactions anaphylactiques et immédiates, toxidermies potentiellement sévères) et pour certains médicaments et substances biologiques (latex et curares en particulier), la majorité des réactions rapportées ne résulte pas d'une hypersensibilité médicamenteuse, mais est plutôt la conséquence des maladies infectieuses et/ou inflammatoires ayant motivé la prescription des médicaments accusés. Certaines réactions non immédiates pourraient aussi résulter d'interactions complexes entre les médicaments, le système immunitaire et des « signaux de danger » produits ou induits par les maladies infectieuses et/ou inflammatoires. Le diagnostic est avant tout basé sur une analyse détaillée de l'histoire clinique, sur les tests cutanés, lorsqu'ils sont validés, et sur les tests de provocation/réintroduction, lorsqu'ils sont justifiés. En effet, sauf exception, la valeur diagnostique et/ou prédictive des tests in vitro explorant les réactions d'hypersensibilité immédiate ou non immédiate est faible ou non validée.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction (données épidémiologiques)

Des réactions présumées liées à une hypersensibilité (HS) médicamenteuse sont rapportées chez 5 à 12 % des enfants, les médicaments et substances biologiques les plus fréquemment accusés étant les anti-infectieux, bêta-lactamines notamment, les antalgiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et, dans une plus faible mesure, les vaccins [1–7]. Les réactions cutanées sont les plus fréquentes, avec, notamment, les exanthèmes maculopapuleux et les éruptions mal étiquetées (60–80 %), et les urticaires et/ou angio-œdèmes (20–30 %), le plus souvent bénins [1,3,7]. Les érythèmes polymorphes, le syndrome de Stevens-Johnson, les érythèmes pigmentés fixes et toxidermies (potentiellement) sévères, comme la pustulose exanthématique aiguë généralisée, la nécro-épidermolyse toxique et le Drug-induced Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) sont rares, sinon exceptionnels. La pseudomaladie sérique n'est pas exceptionnelle, notamment chez les enfants traités par des céphalosporines de première génération. Les réactions respiratoires sont moins fréquentes que les réactions cutanées, bien qu'elles soient rapportées chez 17 à 24 % des enfants explorés pour suspicion d'HS aux AINS [8–10]. Enfin, les réactions anaphylactiques graves sont tout à fait exceptionnelles, même si elles représentent environ 10 % des motifs de consultation dans les services spécialisés.

Les études ayant comporté un bilan allergologique et des examens microbiologiques et/ou sérologiques suggèrent fortement que, sauf pour certains types de réactions (réactions anaphylactiques et immédiates, érythème pigmenté fixe et toxidermies potentiellement sévères) et pour certains médicaments et substances biologiques (latex et curares, notamment), la majorité des réactions présumées allergiques aux médicaments courants de l'enfant ne résulte pas d'une HS médicamenteuse, mais est plutôt la conséquence des maladies infectieuses et/ou inflammatoires pour lesquelles ont été prescrits les médicaments et substances biologiques [11–14]. Certaines réactions non immédiates pourraient aussi résulter d'interactions complexes entre les médicaments ou substances biologiques, le système immunitaire et des « signaux de danger » produits ou induits par les maladies infectieuses et inflammatoires [15].

Grands principes diagnostiques

Anamnèse

La nature et la chronologie des réactions doivent être soigneusement analysées car, quels que soient les médicaments accusés, le risque que l'enfant soit authentiquement atteint d'HS allergique ou non allergique (intolérance) augmente avec la gravité et/ou la précocité de la réaction par rapport au début du traitement ou la dernière prise [8,12,14,16,17]. Le risque est particulièrement élevé chez les enfants rapportant des réactions anaphylactiques graves et des toxidermies (potentiellement) sévères. Il est plus faible chez les enfants rapportant des urticaires et/ou angio-œdèmes de chronologie accélérée ou retardée, sans signes de gravité, ou un syndrome de Stevens-Johnson qui, bien souvent, sont d'origine infectieuse. Enfin, le risque est très faible chez les enfants rapportant des réactions bénignes mal étiquetées ou des exanthèmes maculopapuleux de chronologie retardée. Le risque de réactivité croisée entre les médicaments de la même famille ou doués de propriétés pharmacologiques ou physicochimiques identiques augmente également avec la précocité et le caractère anaphylactique des réactions [8,12,14,16,18,19].

Il faut également rechercher la notion de traitements antérieurs bien tolérés par le médicament accusé ou des médicaments de la même famille, à la recherche d'une sensibilisation antérieure. Cette notion peut toutefois faire défaut dans des cas rares de sensibilisations occultes, lors de traitements au long cours (où la sensibilisation se produit pendant les premières semaines de traitement), ou lors de réactions à des médicaments responsables de réactions d'HS non allergique (antalgiques, antipyrétiques et AINS, par exemple) [20]. Il est également important de rechercher la notion de traitements bien tolérés, depuis la réaction (présumée) allergique, par d'autres médicaments de la même famille, ce qui permet d'éliminer le risque de réactivité croisée et, parfois, d'infirmier le diagnostic d'allergie (présumée) aux médicaments et substances biologiques.

Seront également recherchés, de façon systématique, mais pas toujours justifiée, les antécédents personnels et familiaux d'atopie et/ou d'allergie médicamenteuse présumée ou prouvée.

L'ensemble de ces notions est indiqué dans l'Encadré 1.

Encadré 1: Données de l'anamnèse chez les enfants rapportant des réactions présumées allergiques aux médicaments et substances biologiques.

1. Nature et localisation (initiale et, éventuellement, secondaire) des symptômes :

- signes cutanés :
 - prurit isolé,
 - urticaire et/ou angio-œdème,
 - érythème polymorphe (bulleux ou non), érythrodermie, décollements cutanés spontanés ou au frottement,
 - rash : maculopapuleux, morbilliforme, etc. ;
- autres symptômes :
 - malaise, hypotension/choc,
 - gêne respiratoire (laryngée ou bronchique), dysphonie, dysphagie,
 - poussée fébrile,
 - arthralgies inflammatoires, etc.

2. Chronologie après le début du traitement :

- immédiate ($\leq 1-2$ heures) ;
- accélérée (≤ 48 heures) ;
- retardée (> 48 heures : combien de jours?).

3. Chronologie après la dernière prise (minutes ou heures?).

4. Durée de la réaction après l'arrêt du médicament.

5. Notion éventuelle de majoration des symptômes :

- d'un traitement à un autre ;
- lors des prises suivantes, au cours d'un même traitement.

6. Autres antécédents personnels médicamenteux :

- traitements antérieurs bien tolérés par le même ou d'autres médicaments de la même famille ;
- traitements postérieurs bien tolérés par d'autres médicaments de la même famille (lesquels?) ;
- réactions à d'autres médicaments ou substances biologiques, en précisant leur type, leur chronologie et les substances en cause.

7. Divers :

- antécédents personnels : atopie, divers ;
- antécédents familiaux : réactions aux médicaments ou substances biologiques, divers (atopie, etc.).

substances biologiques (bêtalactamines, curares et vaccins, notamment) [21].

Le diagnostic des réactions d'HS semi-retardée repose principalement sur l'anamnèse, éventuellement associée à des examens biologiques, tels les dosages des IgM/IgG anti-médicament (phénomène d'Arthus, maladie sérique), et des complexes immuns circulants et du complément pendant la période des symptômes (maladie sérique), la recherche d'une éosinophilie sanguine et une étude histologique et immunologique des lésions (vascularites « allergiques »). En effet, les TC à lecture semi-retardée (lus à 6–8 h) ne sont ni standardisés ni validés, même s'ils ont été positifs chez quelques rares enfants rapportant des phénomènes d'Arthus ou des urticaires accélérées après des injections de rappel de vaccins contenant des anatoxines.

À l'exception des patch-tests et des photopatch-tests, dont la valeur diagnostique et prédictive est bien reconnue dans les eczémas, les réactions photo-allergiques et les érythèmes pigmentés fixes, les intradermoréactions (IDR) à lecture retardée et les patch-tests ont donné des résultats incertains et controversés dans les autres réactions d'HS médicamenteuse non immédiate [12,22–26]. La variabilité des réponses aux TC à lecture retardée résulterait du fait que ces affections sont la conséquence d'une réponse immunitaire complexe et évolutive, dont certains stades (IVb et IVc) ne peuvent pas être explorés par les TC à lecture retardée dont nous disposons. Selon la nouvelle classification des réactions d'HS retardée (HSR) aux médicaments [27], il existerait des réactions :

- d'HSR(a) où les cellules effectrices, recrutées et activées par les lymphocytes T du type Th1 (LyTh1) sont des macrophages et des cellules apparentées, comme les cellules dendritiques/de Langerhans (exemple type des eczémas et, peut-être, des érythèmes pigmentés fixes) ;
- d'HSR(b) où les lymphocytes sont des LyTh1 et Th2. En produisant de l'interleukine (IL) 5, ces derniers induisent un important afflux d'éosinophiles dans les lésions (exemple type des exanthèmes maculopapuleux) ;
- d'HSR(c) où, grâce à leur production d'interféron gamma (IFN- γ), les LyTh1 recrutent et activent des lymphocytes T CD8 (cytotoxiques) qui, en produisant de la perforine/*tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), détruisent les cellules cibles (exemples types de la nécroépidermolyse toxique et du DRESS) ;
- d'HSR(d), enfin, où les lymphocytes T libèrent de l'IL-8 et du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-SCF), chimiotactiques et activateurs des polynucléaires neutrophiles (exemple type de la pustulose exanthématique aiguë généralisée).

Les IDR à lecture retardée et les patch-tests ne peuvent pas révéler les sensibilisations retardées du type cytotoxique, ce qui explique probablement leur fréquente négativité dans les érythèmes polymorphes bulleux, les syndromes de Stevens-Johnson, les nécroépidermolyses toxiques et les DRESS. En revanche, ils sont tout à fait capables de révéler les sensibilisations du type classique/tuberculinique (sous-type a) et, à un moindre degré, les sensibilisations retardées des sous-types b et d (cf. classification ci-dessus).

Tests cutanés

Les tests cutanés (TC) à lecture immédiate (prick-tests et intradermoréactions) sont indiqués chez les patients rapportant des réactions évoquant une HS immédiate (HSI, IgE-médiée). Leur valeur diagnostique et/ou prédictive n'est bien établie que pour certains médicaments et

Enfin, on recommande d'effectuer les TC dans un délai de quatre à six semaines à un ou deux ans après la réaction (présumée) allergique, ne serait-ce que pour conserver une anamnèse fiable [28]. Toutefois, les sensibilisations retardées aux médicaments et substances biologiques sont plus durables que les sensibilisations immédiates et peuvent être détectées de nombreuses années après la réaction.

Tests in vitro

Les tests in vitro explorant les réactions d'HSI sont les dosages des IgE sériques spécifiques, les tests de la libération de l'histamine (TLH) ou des leucotriènes (CAST : *cellular antigen stimulation test*) à partir des cellules sanguines, et les tests d'activation des basophiles sanguins (TAB) en cytométrie de flux.

Les dosages des IgE sériques spécifiques ne sont disponibles et/ou fiables que pour certains antibiotiques (pénicilline G, pénicilline V, ampicilline, amoxicilline et céfador), le latex et certains curares, certains constituants des vaccins (anatoxine tétanique, protéines aviaires, gélatine, formaldéhyde) et quelques autres substances (insulines, ACTH, etc.). Leur sensibilité est plus faible que celle des TC à lecture immédiate, probablement parce que la vitesse de disparition des IgE sériques spécifiques est plus rapide que la vitesse de négativation des TC. De plus, ces tests donnent de fréquents faux-positifs chez des sujets tolérant parfaitement certains médicaments et substances biologiques comme, notamment, les insulines.

Les TLH, CAST et TAB peuvent être effectués avec tous les médicaments et substances biologiques, sous réserve qu'ils existent sous forme soluble, et peuvent explorer les réactions d'HSI ou d'HS non allergique (antalgiques, anti-pyrétiques et AINS par exemple). Cependant, ces tests ne peuvent être effectués que par des laboratoires bien équipés et bien entraînés, nécessitent d'importantes quantités de sang et ne sont pas remboursés par la Sécurité Sociale. Enfin, malgré des progrès récents [29], leur valeur diagnostique varie considérablement d'une substance à une autre et d'un test à un autre pour une même substance [30].

Les tests in vitro explorant les réactions d'HS non immédiate sont les tests de transformation/activation/prolifération lymphocytaire et les tests dosant les cytokines (IFN- γ notamment) produites par les lymphocytes T activés. Ces tests peuvent être effectués avec tous les médicaments et substances biologiques, à condition qu'ils existent sous forme soluble et stérile. Cependant, comme les TLH, CAST et TAB, ces tests sont réservés à des laboratoires parfaitement équipés et entraînés, sont « gourmands » en sang et ne sont pas remboursés par la Sécurité Sociale. Enfin, et malgré d'importants progrès récents [31–34], leur sensibilité et leur spécificité restent faibles pour la grande majorité des médicaments et des faux-positifs sont fréquemment observés chez des patients atteints d'une authentique HSI médicamenteuse [35–37].

Pour toutes ces raisons, les tests in vitro explorant les réactions d'HS immédiate et non immédiate aux

médicaments et substances biologiques ont des indications limitées (patients chez lesquels les TC ne sont pas réalisables, médicaments et substances biologiques pour lesquels les TC ne sont pas validés et patients chez lesquels les TC sont négatifs malgré une histoire clinique hautement évocatrice) [38,39].

Tests de provocation/réintroduction (TP)

Lorsque les TC et les tests in vitro ne sont pas fiables, ne peuvent pas être effectués, sont ininterprétables (hypo-réactivité cutanée ou dermatographe), ou sont négatifs malgré une histoire clinique plus ou moins évocatrice, les TP représentent le seul moyen qui permet avec une (quasi) certitude de confirmer ou d'infirmer le diagnostic d'HS médicamenteuse [40]. Ces tests doivent être effectués en milieu (de type) hospitalier disposant de moyens de réanimation lorsqu'ils sont effectués chez des patients ayant présenté des réactions (potentiellement) graves de chronologie immédiate ou accélérée. Diverses équipes font aussi effectuer les TP à domicile, sur plusieurs jours consécutifs, chez les patients ayant présenté des réactions peu graves de chronologie retardée [14,24,41].

Quelles qu'en soient les modalités, les TP sont contre-indiqués chez les patients ayant présenté des réactions graves (toxidermies potentiellement sévères notamment) et/ou à des médicaments jugés inutiles ou peu utiles, et pour lesquels il existe des traitements alternatifs efficaces. Chez ces patients, les tests de réintroduction doivent être effectués avec des médicaments de la même famille, censés ne présenter aucune réactivité croisée avec les médicaments accusés.

Conclusion : attitude pratique

Les enfants rapportant des réactions plus ou moins évocatrices d'HS médicamenteuse doivent faire l'objet d'un bilan allergologique. Ce bilan est essentiellement basé sur un interrogatoire détaillé, des TC, lorsqu'ils sont réalisables et validés, et, éventuellement, un TP, lorsqu'il est justifié. La place des examens biologiques est limitée.

En pratique :

- chez les enfants rapportant des réactions anaphylactiques et/ou de chronologie immédiate, tous les médicaments ou substances biologiques appartenant à la même famille doivent, au moins temporairement, être contre-indiqués, car il existe un risque élevé de réactivité croisée. Un bilan, comportant des TC à lecture immédiate à la substance suspecte et avec d'autres substances de la même classe et de classes différentes (si réalisables et validés) et des TP (si justifiés, lorsque les TC sont négatifs), doit être effectué pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'allergie médicamenteuse et pour déterminer si l'enfant est sensibilisé à une ou plusieurs (classes de) médicaments de la même famille chimique ou pharmacologique. Idéalement, ce bilan devrait être effectué dans les quatre à six semaines suivant la réaction [28] et, dans tous les cas le plus rapidement possible, car, comme cela a bien été démontré pour les bêta-lactamines, les TC et les tests in vitro explorant l'HSI aux médicaments et substances

biologiques tendent à se négativer rapidement, alors même que les patients conservent leur allergie [42,43] ;

- chez les enfants rapportant des urticaires et/ou angio-œdèmes non immédiats et sans signes de gravité, il est aussi recommandé d'effectuer un bilan allergologique qui, pour certains auteurs, peut se limiter à un TP prolongé, au domicile de l'enfant, au moins dans un premier temps. Pour l'enfant, le risque d'être réellement atteint d'HS médicamenteuse et, si tel est le cas, le risque de réactivité croisée étant relativement faibles, il est en principe possible, dans l'attente, de prescrire des médicaments de la même famille mais d'une autre classe que celle qui est suspectée ;
- chez les enfants rapportant une pseudomaladie sérique, la valeur diagnostique des TC à lecture non immédiate est discutée. Le consensus international recommande de contre-indiquer définitivement la substance suspecte tout en autorisant les autres substances de la même classe et d'autres classes. Cependant, des études plus ou moins récentes ont montré que la majorité des enfants chez lesquels les TC étaient négatifs toléraient parfaitement les TP effectués à dose thérapeutique pendant plusieurs jours consécutifs, ce qui suggère fortement que, chez de nombreux enfants, la pseudomaladie sérique ne résulte pas d'une réaction d'HS médicamenteuse ;
- chez les enfants rapportant un érythème polymorphe ou un syndrome de Stevens-Johnson, il est possible, lorsque le diagnostic d'infection (HSV, mycoplasmes, coxsackies, etc.) a été réfuté ou n'a pas été effectué, d'effectuer des TC à lecture non immédiate. Compte tenu de la faible valeur diagnostique de ces tests, évoquée plus haut, leur négativité n'exclut pas le diagnostic d'HS non immédiate, et le consensus international recommande une contre-indication définitive des médicaments suspects. Cependant, dans notre expérience, la majorité des enfants rapportant un érythème polymorphe ou un syndrome de Stevens-Johnson et ayant des TC négatifs ont toléré les TP, sur plusieurs jours et à dose thérapeutique usuelle, suggérant, là encore, que chez de nombreux enfants, ces affections ne résultent pas d'une HS médicamenteuse ;
- chez les rares enfants rapportant des réactions à type de pustulose exanthématique aiguë généralisée, nécroépidermolyse toxique et DRESS, les TC à lecture non immédiate peuvent aussi être effectués. Toutefois, comme dans le cas des érythèmes polymorphes et syndrome de Stevens-Johnson, la négativité de ces tests n'exclut pas le diagnostic d'HS médicamenteuse, et les TP sont formellement contre-indiqués compte tenu du risque élevé de récurrence grave, voire aggravée, et, même dans le doute, il convient de contre-indiquer définitivement les médicaments suspects et de structure proche ;
- dans les autres cas, comme les éruptions bénignes non identifiées et les exanthèmes maculopapuleux de chronologie non immédiate, les TC sont probablement inutiles et le diagnostic d'HS médicamenteuse est généralement infirmé sur la tolérance des TP, effectués au domicile pendant plusieurs jours consécutifs et en dehors de tout épisode infectieux, quitte à effectuer secondairement des TC chez les rares enfants récidivant lors du TP.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Buajordet I, Wesenberg F, Brørs O, Langslet A. Adverse drug events during hospitalization and drug discharge in a Norwegian University Hospital. *Acta Paediatr* 2002;91:88–94.
- [2] Gonzalez-Martin A, Caroca CM, Paris E. Adverse drug reactions (ADRs) in hospitalized pediatric patients: a prospective study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:530–3.
- [3] Ibia EO, Schwartz RH, Wiedermann BL. Antibiotic rashes in children: a survey in a private practice setting. *Arch Dermatol* 2000;136:849–54.
- [4] Lange L, Koningsbruggen SV, Rietschel E. Questionnaire-based survey of lifetime prevalence and character of allergic drug reactions in German children. *Pediatr Allergy Immunol* 2008;19:634–8.
- [5] Le J, Nguyen T, Law AV, Hodding J. Adverse drug reactions among children over a 10-year period. *Pediatrics* 2006;118:555–62.
- [6] Martinez-Mir I, Garcia-Lopez M, Palop V, Ferrer JM, Rubio E, Morales-Olivas FJ. A prospective study of adverse drug reactions in hospitalized children. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:681–8.
- [7] Menneti-Ippolito F, Paschetti R, Dacas R, Giaquinto C, Cantarutti L. Active monitoring of adverse drug reactions. *Lancet* 2000;355:1613–4.
- [8] Hassani A, Ponvert C, Karila C, Le Bourgeois M, de Blic J, Scheinmann P. Hypersensitivity to analgesics, antipyretics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in children: a study of 164 cases. *Eur J Dermatol* 2008;18:1–5.
- [9] Kidon MI, Kang LW, Chin CW, Hoon LS, See Y, Goh A, et al. Early presentation with angioedema and urticaria in cross-reactive hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs among young, Asian, atopic children. *Pediatrics* 2005;116:e675–80.
- [10] Sanchez-Borges M, Capriles-Behrens E, Caballero-Fonseca F. Hypersensitivity to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:376–80.
- [11] Martin-Munoz F, Moreno-Ancillo A, Dominguez-Noche C, Diaz-Pena JM, Garcia-Ara C, Boyano T, et al. Evaluation of drug-related hypersensitivity reactions in children. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1999;9:172–7.
- [12] Ponvert C, Perrin Y, Le Bourgeois M, Karila C, Delacourt C, Scheinmann P, et al. Allergy to betalactams in 1865 children: results of a 20-year study based on skin and challenge tests, and clinical history. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:411–8.
- [13] Rebelo-Gomez E, Fonseca J, Araujo L, Demoly P. Drug allergy claims in children: from self-reporting to confirmed diagnosis. *Clin Exp Allergy* 2008;38:191–8.
- [14] Romano A, Gaeta F, Valluzzi R, Alonzi C, Viola M, Bousquet PJ. Diagnosing hypersensitivity reactions to cephalosporins in children. *Pediatrics* 2008;122:521–7.
- [15] Séguin B, Uetrecht J. The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003;3:235–42.
- [16] Atanaskovic-Markovic M, Cirkovic-Kelickovic T, Gavrovic-Jankulovic M, Vuckovic O, Nestorovic B. Immediate allergic reactions to cephalosporins and penicillins and their cross-reactivity in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:341–6.
- [17] Pichichero ME, Pichichero DM. Diagnosis of penicillin, amoxicillin and cephalosporin allergy: reliability of examination

- assessed by skin testing and oral challenge. *J Pediatr* 1998;132:137–43.
- [18] Romano A, Gaeta F, Valluzzi RC, Caruso C, Rumi G, Bousquet JP. IgE-mediated hypersensitivity to cephalosporins: cross-reactivity and tolerability of penicillins, monobactams and carbapenems. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:994–9.
- [19] Titchen T, Cranswick N, Beggs S. Adverse drug reactions to nonsteroidal anti-inflammatory drugs, COX-2 inhibitors and paracetamol in a paediatric hospital. *Br J Clin Pharmacol* 2005;59:718–23.
- [20] Cousin F, Philips K, Favier B, Bienvenu J, Nicolas JF. Drug-induced urticaria (review article). *Eur J Dermatol* 2001;11:181–7.
- [21] Ponvert C. Valeur diagnostique et prédictive des tests cutanés aux médicaments et substances biologiques. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006;46:14–28.
- [22] Barbaud A. Patch-tests médicamenteux dans l'exploration des toxidermies. *Ann Dermatol Venerol* 2009;136:635–44.
- [23] Blanca-López N, Zapatero L, Alonso E, Torres MJ, Fuentes V, Martínez-Molero MI, et al. Skin testing and drug provocation in the diagnosis of non-immediate reactions to aminopenicillins in children. *Allergy* 2009;64:229–33.
- [24] Padial A, Antunez C, Blanca-Lopez N, Fernandez TD, Cornejo-Garcia JA, Mayorga C, et al. Non-immediate reactions to betalactams: diagnostic value of skin testing and drug provocation test. *Clin Exp Allergy* 2008;38:822–8.
- [25] Ponvert C, Le Bourgeois M, Karila C, de Blic J, Scheinmann P. L'allergie aux bêta-lactamines chez l'enfant: diagnostic des réactions d'hypersensibilité non immédiate par les tests cutanés (intradermoréactions et patch-tests) et les tests de réintroduction par voie orale. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2004;44:379–81.
- [26] Wolkenstein P, Chosidow O, Flechet ML, Rebbiola O, Paul M, Dume L, et al. Patch testing in severe cutaneous adverse drug reactions, including Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Contact Dermatitis* 1996;35:234–6.
- [27] Pichler WJ. Immune mechanisms of drug hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24:373–97.
- [28] Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler WJ, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002;57:45–51.
- [29] Abuaf N, Rostane H, Rajoely B, Gaouar H, Autegarden JE, Leynadier F, et al. Comparison of two basophil activation markers CD63 and CD203c in the diagnosis of amoxicillin allergy. *Clin Exp Allergy* 2008;38:921–8.
- [30] Mayorga C, Sanz ML, Gamboa PM, Garcia BE. On behalf of the Clinical Immunology Committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology and Clinical Immunology of the SECAIC. In vitro diagnosis of immediate allergic reactions to drugs: an update. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2010;20:103–9.
- [31] Lochmatter P, Beeler A, Kawabata TT, Gerber BO, Pichler WJ. Drug-specific in vitro release of IL-2, IL-5, IL-13 and IFN-gamma in patients with delayed-type drug hypersensitivity. *Allergy* 2009;64:1269–78.
- [32] Martin M, Wurpts G, Ott H, Baron JM, Erdmann S, Merk HF, et al. In vitro detection and characterization of drug hypersensitivity using flow cytometry. *Allergy* 2010;65:32–9.
- [33] Rozières A, Hennino A, Rodet K, Gutowski MC, Gunera-Saad N, Berard F, et al. Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy. *Allergy* 2009;64:534–42.
- [34] Zawodniak A, Lochmatter P, Yerly D, Kawabata D, Lerch M, Yawalkar N, et al. In vitro detection of cytotoxic T and NK cells in peripheral blood of patients with various drug-induced skin diseases. *Allergy* 2010;65:376–84.
- [35] Gaspard I, Guinépain MT, Laurent J, Bachot N, Kerdine S, Bertoglio J, et al. IL-4 and IFN- γ mRNA production in human peripheral lymphocytes specific for betalactam antibiotics in immediate or delayed hypersensitivity reactions. *J Clin Immunol* 2000;20:107–17.
- [36] Luque I, Leyva L, Torres JM, Rosal M, Mayorga C, Segura JM, et al. In vitro T cell responses to betalactam drugs in immediate and non-immediate allergic reactions. *Allergy* 2001;56:611–8.
- [37] Saurat JH, Ponvert C, Burtin C, Soubrane C, Lebel B, Beucher F, et al. Lymphocyte transformation, leucocyte migration, specific IgE, IgM and IgE, before, during and after penicillin treatment without adverse reaction. A follow-up study. *Acta Allergol* 1976;31:1–17.
- [38] De Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Sturm G, Bilo MB, et al. Diagnosis of immediate-type betalactam allergy by flow-cytometric basophil activation test and sulfidoleukotriene production: a multicenter study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2009;19:91–109.
- [39] Romano A, Demoly P. Recent advances in the diagnosis of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007;7:299–303.
- [40] Aberer W, Bircher A, Romano A, Blanca M, Campi P, Fernandez J, et al. Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations. *Allergy* 2003;58:854–63.
- [41] Blanca-Lopez N, Zapatero L, Alonso E, Torres MJ, Fuentes V, Martínez-Momero MI, et al. Skin testing and drug provocation in the diagnosis of non-immediate reactions to aminopenicillins in children. *Allergy* 2009;64:229–33.
- [42] Blanca M, Torres MJ, Garcia JJ, Romano A, Mayorga C, de Ramon E, et al. Natural evolution of skin test sensitivity in patients allergic to betalactams. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:928–1024.
- [43] Fernandez TD, Torres MJ, Blanca-Lopez N, Rodriguez-Bala JL, Gamoz E, et al. Negativization rates of IgE radioimmunoassay and basophil activation test in immediate reactions to penicillins. *Allergy* 2009;63:242–8.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Fréquences géniques des systèmes HPA-1 et HPA-2 et risque potentiel d'allo-immunisation dans une population tunisienne

Gene frequencies of HPA-1 and HPA-2 systems and potential risk of allo-immunization in a Tunisian population

I. Jedidi, H. Romdhane, T. Chakroun, S. Abdelkefi, B. Houissa,
I. Jerray, M. Bouslama, S. Jemni Yacoub*

Centre régional de transfusion sanguine, hôpital Farhat Hached, rue Ibn El-Jazzar, 4000 Sousse, Tunisie

Reçu le 9 octobre 2012 ; accepté le 20 décembre 2012

KEYWORDS

Human platelet antigen (HPA);
PCR-SSP;
Allele frequency;
Genotype frequency;
Potential risk of allo-immunization

MOTS CLÉS

Antigène plaquettaire humain (HPA) ;
PCR-SSP ;
Fréquence allélique ;
Fréquence génotypique ;
Risque potentiel d'allo-immunisation

Summary Allele and genotype frequencies of HPA-1 and HPA-2 systems in a Tunisian population were determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 100 volunteer blood donors. The risk of allo-immunization in these systems has subsequently been evaluated. This work shows a higher HPA-1b (0.195) and HPA-2b (0.150) allelic frequency, which can be responsible for the potential risk of allo-immunization in HPA-1 and HPA-2 systems in case of pregnancy or transfusion.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Les fréquences alléliques et génotypiques des systèmes HPA-1 et HPA-2 dans une population tunisienne ont été déterminées par une réaction de polymérisation en chaîne avec des amorces séquences-spécifiques (PCR-SSP) sur 100 donneurs de sang volontaires. Le risque d'allo-immunisation dans ces systèmes a par la suite été évalué. Ce travail a montré une fréquence allélique relativement élevée pour HPA-1b (0,195) et pour HPA-2b (0,150) qui semble être responsable du risque potentiel d'allo-immunisation dans les systèmes HPA-1 et HPA-2 en cas de grossesse ou de transfusion.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Les antigènes spécifiquement plaquettaires, appelés *human platelet antigen* (HPA), de structure polymorphe, sont impliqués dans des conflits immunologiques tels que la

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : saloua.jemni@rns.tn (S. Jemni Yacoub).

thrombocytopénie néonatale allo-immune (TNNAI), les états réfractaires aux transfusions de plaquettes et le purpura post-transfusionnel (PTP) [1]. Aujourd'hui, on compte six systèmes bi-alléliques (HPA-1 à 5 et -15), ainsi que 21 antigènes mono-alléliques (HPA-6 à -14bw, et HPA-16 à -27bw) [2]. La fréquence de ces antigènes et leur prévalence dans une population donnée présentent un déterminant majeur de leur risque d'allo-immunisation et de leurs implications cliniques associées. Les TNNAI impliquent le plus souvent les systèmes HPA-1, -3 et -5 chez les Caucasiens [3,4] et les systèmes HPA-4 et -5 chez les Orientaux [5]. La plupart des cas de PTP [6], TNNAI [4] et des états réfractaires aux transfusions de plaquettes [7] étaient liés à l'antigène HPA-1a, qui est la forme la plus immunogène.

Jusqu'à présent, seulement quelques études, concernant les systèmes HPA-1 et -2 en Afrique du Nord, sont disponibles. Étant donné que la Tunisie a été une cible de migration de toutes les populations et que la fréquence des antigènes plaquettaires varie considérablement d'un groupe ethnique à un autre, nous nous sommes fixés pour objectif d'étudier le polymorphisme des systèmes HPA-1 et HPA-2 et d'estimer le risque potentiel d'allo-immunisation.

Matériels et méthodes

Population d'étude

La population d'étude se compose de 100 donneurs de sang (51 hommes et 49 femmes) volontaires, sains, non apparentés, recrutés au hasard au centre régional de transfusion sanguine de Sousse (Tunisie).

Génotypage des systèmes HPA-1 et HPA-2 par PCR-SSP

Pour chaque donneur un échantillon de sang total a été prélevé sur EDTA pour extraire l'ADN. La méthode «salting-out» décrite par Miller [8] a été utilisée pour isoler l'ADN génomique à partir des cellules nucléées de sang total.

Le génotypage dans les systèmes HPA-1 et HPA-2 a été réalisé par PCR-SSP selon le protocole décrit par Feng et al. [9] avec quelques modifications. Trois amorces pour chaque système HPA ont été utilisées (Tableau 1), une première est spécifique à l'allèle «a», une deuxième est spécifique à

l'allèle «b» et une troisième spécifique au brin complémentaire. Un couple d'amorces spécifiques d'une région conservée du gène codant l'hormone de croissance humaine (HGH) a été utilisé comme contrôle interne pour valider la réaction de PCR. Toutes les amorces ont été vérifiées selon les informations obtenues à partir des banques des gènes et des données des séquences publiées [9,10].

Les deux réactions PCR pour le génotypage des systèmes HPA-1 et HPA-2 ont été réalisées dans un volume réactionnel final de 25 µL comprenant 2,5 µL de l'échantillon d'ADN purifié (100–200 ng/µL); 2,5 µL de tampon 10X; 200 µM dNTP; 2 mM MgCl₂; 1,5 U TAQ polymérase et 0,2 µM de chaque amorce spécifique des allèles a et b des systèmes HPA-1 et HPA-2 et du contrôle interne.

Le programme de PCR a été le même pour les systèmes HPA-1 et HPA-2; après dénaturation pendant cinq minutes à 95 °C, les échantillons ont été soumis à 30 cycles de PCR dans un thermocycleur (PCR GeneAmp® System 9700). Chaque cycle comprend une phase de dénaturation (95 °C, 30 s), une phase d'hybridation (58 °C, 30 s) et une phase d'extension (72 °C, 90 s). Ces cycles ont été suivis par une extension finale à 72 °C pendant cinq minutes. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %.

Formules et analyse statistique

Les fréquences génotypiques et alléliques ont été déterminées par comptage direct. Le nombre de sujets attendu pour chaque génotype a été calculé en utilisant les formules suivantes : $(2 \times f[a] \times f[b] \times n)$ pour les hétérozygotes et $((f[a] \text{ ou } f[b])^2 \times n)$ pour les homozygotes, où $f[a]$ et $f[b]$ sont respectivement les fréquences des allèles a et b des systèmes HPA-1 et HPA-2 et «n» est le nombre de sujets dans la population étudiée. La vérification de l'équilibre de Hardy-Weinberg a été testée en comparant le nombre attendu (Exp) avec le nombre observé (Obs) pour chaque génotype en appliquant la formule suivante : $\chi^2 = \text{Somme} (\text{Obs} - \text{Exp})^2 / \text{Exp}$, pour un degré de liberté (ddl) égale à 1. Le seuil significatif choisi était de 0,05. Le risque potentiel d'allo-immunisation par grossesse et par transfusion, lié aux antigènes a et b des deux systèmes HPA-1 et HPA-2, a été calculé en utilisant des formules employées par De La Vega et al. [1]. Ainsi, le risque potentiel d'allo-immunisation par grossesse estimait la chance d'être en situation d'incompatibilité fœtomaternelle selon la

Tableau 1 Amorces utilisées pour le génotypage des systèmes HPA.

Gène	Allèle	Séquence d'amorce (5'→3')	Mutation ponctuelle	Tm (°C)	Taille de produit d'amplification (bp)
HPA-1	Allèle «a»	1aF ACTTACAGGCCCTGCCTCT	176T	59	188
	Allèle «b»	1bF ACTTACAGGCCCTGCCTCC	176C	62	
	Anti-sens	1R GTGCAATCCTCTGGGGACT		59	
HPA-2	Allèle «a»	2aF CCCCCAGGGCTCCTGAC	482C	62	241
	Allèle «b»	2bF CCCCCAGGGCTCCTGAT	482T	63	
	Anti-sens	2R GCCAGCGACGAAAATAGAGG		60	
HGH	Sens	HGHF GCCTTCCCAACCATTCCCTTA	-	61	427
	Anti-sens	HGHR TCACGGATTCTGTTGTGTTTC		58	

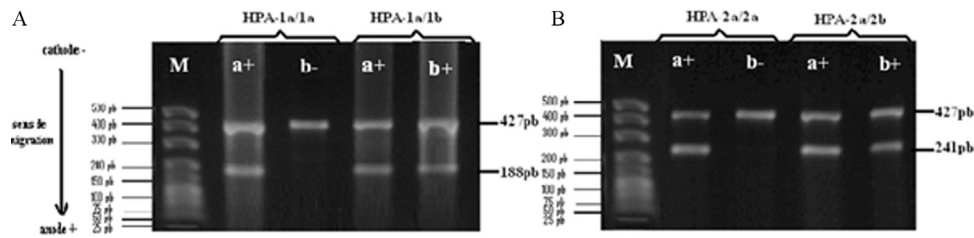


Figure 1 A. Génotypage du système HPA-1 par PCR-SSR. B. Génotypage du système HPA-2 par PCR-SSR. 427 pb : contrôle interne ; 188 pb et 241 pb : amplicons spécifiques des allèles « a » et « b » pour les systèmes HPA-1 et HPA-2 respectivement.

formule : $[(1 - p_m)^2 \times p_p]$, où p_m est la fréquence allélique dans la population des mères (sujets de sexe féminin dans notre étude) et p_p est la fréquence allélique dans la population des pères (sujets de sexe masculin dans notre étude). Le risque potentiel d'allo-immunisation par transfusion estimait la chance de recevoir une transfusion incompatible en utilisant la formule $[(1 - p_r)^2 \times (2p_d - p_d^2)]$, où p_r est la

fréquence allélique dans la population des receveurs et p_d est la fréquence allélique dans la population des donneurs. Vu que notre étude porte sur un seul échantillon de la population tunisienne, les fréquences alléliques générales ont été utilisées, aussi bien pour les donneurs que pour les receveurs, la formule utilisée est alors $[(1 - p)^2 \times (2p - p^2)]$, où p est la fréquence allélique dans la population d'étude.

Tableau 2 Fréquences alléliques des systèmes HPA-1 et HPA-2.

Population	HPA-1		HPA-2		Références
	1a	1b	2a	2b	
Présent travail (n = 100)	0,805	0,195	0,850	0,150	Cette étude [11]
Tunisienne (Mojaat et al.) (n = 93)	0,750	0,250	—	—	
Quelques populations africaines					
Algérienne					[12]
Annaba	0,793	0,207	0,819	0,181	
East	0,836	0,164	0,852	0,148	
Kabyle	0,887	0,113	0,825	0,175	
Middle	0,873	0,127	0,853	0,147	
Mzab	0,841	0,159	0,835	0,165	
West	0,823	0,177	0,853	0,147	
Tuareg	0,790	0,210	0,806	0,194	
Berbères de Maroc	0,748	0,252	0,818	0,182	[13]
Quelques populations européennes					
Espagnole	0,810	0,190	0,900	0,100	[14]
Danoise	0,831	0,169	0,917	0,083	[15]
Allemande	0,839	0,161	0,910	0,090	[16]
Royaume-Uni	0,840	0,160	0,925	0,075	[17]
Hollandaise	0,846	0,154	0,934	0,066	[18]
Française	0,848	0,152	0,920	0,080	[19]
Italienne	0,850	0,150	0,890	0,110	[20]
Polonaise	0,874	0,126	0,898	0,102	[21]
Quelques populations asiatiques					
Coréenne	0,988	0,012	0,923	0,077	[22]
Taïwanaise	0,997	0,003	0,960	0,040	[10]
Japonaise	0,998	0,002	0,900	0,100	[23]
Chinoise	0,994	0,006	0,952	0,048	[9]
Quelques populations américaines					
Argentine	0,878	0,122	0,875	0,125	[1]
Mexicaine	0,951	0,049	0,841	0,159	[24]
Amérindienne	1,000	0,000	0,821	0,179	[25]

— : non testé.

Tableau 3 Risque potentiel d'allo-immunisation associé aux antigènes des systèmes HPA-1 et HPA-2, par grossesse et par transfusion, chez les Tunisiens, les Caucasiens et les Amérindiens.

Antigènes	Tunisiens Grossesse/transfusion [cette étude]	Caucasiens Grossesse/transfusion [1]	Amérindiens Grossesse/transfusion [1]
HPA-1a	0,037/0,036	0,013/0,015	0,000/0,000
HPA-1b	0,108/0,228	0,094/0,177	0,000/0,000
HPA-2a	0,019/0,021	0,014/0,015	0,003/0,003
HPA-2b	0,105/0,200	0,096/0,179	0,050/0,097

Résultats et discussion

Le génotypage des systèmes HPA-1 et HPA-2 a été réalisé pour 100 donneurs de sang (Fig. 1). La distribution génotypique du système HPA-1 était 0,62 ; 0,37 et 0,01 respectivement pour les génotypes HPA-1a/a, HPA-1a/b et HPA-1b/b et celle du système HPA-2 était 0,72 ; 0,26 et 0,02 respectivement pour les génotypes HPA-2a/a, HPA-2a/b et HPA-2b/b. L'homozygote a/a présente le génotype le plus fréquent que ce soit pour le système HPA-1 ou pour le système HPA-2. Les homozygotes b/b sont rares pour les deux systèmes étudiés. Les fréquences alléliques des systèmes HPA-1 et HPA-2, déterminées par cette étude, sont données dans le Tableau 2. Les fréquences des allèles HPA-a sont plus élevées que celles des allèles HPA-b pour ces deux systèmes (0,805 et 0,195 respectivement pour les allèles HPA-1a et HPA-1b, 0,850 et 0,150 respectivement pour les allèles HPA-2a et HPA-2b). L'équilibre de Hardy-Weinberg au sein de chaque groupe génotypique a été vérifié, et la différence entre les fréquences génotypiques calculées et observées n'était pas significative aussi bien pour le système HPA-1 ($\chi^2 = 3,18$; $p > 0,05$) que pour le système HPA-2 ($\chi^2 = 0,038$; $p > 0,05$).

Les fréquences alléliques des systèmes HPA-1 et HPA-2 dans différentes populations africaines, européennes, asiatiques et américaines sont données dans le Tableau 2. Nous avons constaté que les fréquences alléliques des systèmes HPA-1 déterminées dans cette étude se rapprochent de celles déjà rapportées en 1999, par Mojaat et al. [11] ainsi que de celles rapportées chez les différents groupes ethniques de l'Algérie [12], les berbères du Maroc [13] et les Espagnols [14]. Nos résultats ont montré des fréquences un peu plus élevées pour les allèles HPA-1b par rapport à certaines populations caucasiennes, et encore plus élevées par rapport aux populations asiatiques et américaines (Tableau 2). Chez ces derniers, une tendance à une homogénéité a été notée. L'allèle « a » est prédominant, aussi bien pour le système HPA-1 que pour le système HPA-2, pouvant aller jusqu'à l'absence totale de l'antigène HPA-1b dans la population amérindienne [25]. Dans notre étude, l'hétérogénéité notée pourrait être expliquée par la localisation géographique qu'occupe la Tunisie la rendant cible de migration et de mélange ethnique de groupes de populations possédant des héritages génétiques différents [26].

Dans cette étude, nous avons choisi la méthode de PCR-SSP pour le génotypage des systèmes HPA-1 et HPA-2, vu sa rapidité, son faible coût et sa fiabilité permettant la détection simultanée de multiples systèmes HPA [10].

Cependant, de fausses réactions peuvent être observées, lors de l'utilisation de cette technique, comme celle décrite par Bertrand et al. [27], liée à une mutation silencieuse identifiée sur l'exon 3 de la GPIIIa (262T>C), qui peut empêcher l'amplification de l'allèle HPA-1a et donc donner un faux génotype HPA-1b/b au lieu de HPA-1a/b. Il faut noter que dans notre étude, cette difficulté a pu être surmontée puisque les amorces choisies tiennent compte de cette mutation.

Le risque d'allo-immunisation par grossesse/risque d'allo-immunisation par transfusion associé à l'antigène HPA-1a est plus élevé que celui rapporté chez les Caucasiens ainsi que chez les Amérindiens (Tableau 3). Ces derniers présenteraient un risque d'allo-immunisation négligeable pour les antigènes du système HPA-1, pouvant être lié à la fréquence extrêmement faible, voire l'absence de l'allèle HPA-1b dans cette population [1]. En revanche, le risque d'allo-immunisation par grossesse/risque d'allo-immunisation par transfusion lié aux antigènes du système HPA-2 se rapproche de celui publié chez les Caucasiens (Tableau 3). Cela pourrait être lié aux fréquences génotypiques du système HPA-2, qui sont comparables pour les populations tunisienne et caucasienne (0,72 ; 0,26 et 0,02 respectivement pour HPA-2a/a, HPA-2a/b et HPA-2b/b, dans la population tunisienne ; 0,771 ; 0,208 et 0,021 respectivement pour HPA-2a/a, HPA-2a/b et HPA-2b/b, dans la population caucasienne) [1].

Conclusion

L'hétérogénéité notée dans la distribution allélique des systèmes HPA-1 et HPA-2 prédit un risque potentiel d'allo-immunisation antiplaquettaire. Il est ainsi nécessaire de développer l'exploration des thrombopénies néonatales et d'allo-immunisation transfusionnelle par l'introduction du génotypage, la recherche des anticorps et l'élaboration d'un registre des donneurs de plaquettes, à génotypes rares (à savoir, les homozygotes HPA-1b/b), pour les convoquer en cas de prise en charge transfusionnelle des thrombopénies néonatales et d'allo-immunisation transfusionnelle.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] De La Vega Elena CD, Nogués N, Fernández Montoya A, Chialino S, Blanzaco PD, Theiller E, et al. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. *Transfus Med* 2008;18:83–90.
- [2] The Immune Polymorphism Database (EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table.html>).
- [3] Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363–6.
- [4] Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigens-specific all antibodies implicated in 1162 cases of neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Transfusion* 2004;44:1220–5.
- [5] Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med* 2004;14:399–408.
- [6] Kaplan C. Le purpura post transfusionnel. *Hematologie* 2006;12:61–5.
- [7] Ketty L. L'anti-HPA1, l'anti-HPA5... et maintenant l'anti-Gov responsable d'inefficacité des transfusions de plaquettes. *Hematologie* 2001;7:11.
- [8] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:215.
- [9] Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, et al. Establishment of an HPA-1- to -16-typed donor registry in China. *Transfus Med* 2006;16:369–74.
- [10] Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, Lin JS, Tzeng CH. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion* 2002;42:1089–95.
- [11] Mojaat N, Halle L, Proulle V, Hmida S, Ben Hamed L, Boukef K, et al. Gene frequencies of human platelet antigens in the Tunisian population. *Tissue Antigens* 1999;54:201–4.
- [12] Brouk H, Halle L, Bertrand G, Neche FZ, Ouelaa H, et Kaplan C. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations. *Tissue Antigens* 2009;75:673–8.
- [13] Ferrer G, Muñoz-Díaz E, Aluja MP, Arilla M, Martínez C, Nogués R, et al. Analysis of human platelet antigen systems in a Moroccan Berber population. *Transfus Med* 2002;12:49–54.
- [14] Muniz-Díaz E, Martínez C, Arilla M, Ibañez M, García M, Pastoret C, et al. Frecuencia de los antígenos plaquetarios específicos de los sistemas HPA-1, -2, -3, -4, -5, y -6 en población española. *Haematologica* 1998;83:162.
- [15] Steffensen R, Kaczam E, Varming K, Jersild C. Frequency of platelet-specific alloantigens in a Danish population. *Tissue Antigens* 1996;48:93–6.
- [16] Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3, and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 1996;71:121–5.
- [17] Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Jeune NT, Marshall SE. Human platelet antigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet* 2003;30:415–9.
- [18] Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, et al. Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993;81:835–40.
- [19] Merieux Y, Debost M, Bernaud J, Raffin A, Meyer F, Rigal D. Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Pathol Biol* 1997;45:697–700.
- [20] Mazzucco L, et al. Proceedings of the 6th European Symposium on platelet. *Granulocyte and Red Cell Immunobiology (Abstract)*. Amsterdam; 2000.
- [21] Drzewek K, Brojer E, Zupanska B. The frequency of human platelet antigen HPA genotypes in the Polish population. *Transfus Med* 1998;8:339–42.
- [22] Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno JE, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998;8:129–32.
- [23] Tanaka S, Taniue A, Nagao N, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, et al. Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3, and 4 by an allele-specific PCR method. *Vox Sang* 1995;68:225–30.
- [24] Nogues N, Subirana L, Garcia MA. Human platelet alloantigens in a Mexican population: a comparative gene frequency study. *Vox Sang* 2000;78:60.
- [25] Cardone JD, Chiba AK, Boturao-Neto E, Vieira Filho JP, Bordin JO. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. *Transfus Med* 2004;14:433–7.
- [26] Feingold J. Génétique médicale et migration. *Rev Med Interne* 1988;9:89–92.
- [27] Bertrand G, Bianchi F, Chenet C, Martageix C, Blanchet P, Baumler M, et al. New mutation in the platelet $\beta 3$ -integrin gene: implication for the diagnosis of fetomaternal alloimmunization. *Transfusion* 2006;46:2138–41.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Hypersensibilité médicamenteuse à l'abacavir

Abacavir-mediated hypersensitivity syndrome

V. Moalic-Allain

Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, pôle de pathologie biologique, CHRU Morvan, bâtiment 5 bis, 2, avenue Foch, 29609 Brest cedex, France

Reçu le 17 décembre 2012 ; accepté le 19 décembre 2012

KEYWORDS

Hypersensitivity;
Abacavir;
HLA-B*57:01;
HIV;
Pharmacogenetics

MOTS CLÉS

Hypersensibilité ;
Abacavir ;
HLA-B*57:01 ;
VIH ;
Pharmacogénétique

Summary Drug-induced hypersensitivity reaction is an unpredictable adverse effect from therapeutics. Diagnosis is not easy and a potentially life-threatening reaction can occur in case of late stop treatment. Abacavir drug hypersensitivity in HIV-treated patients is well known since many years. Some genetic factors such as carriage of allele HLA-B*57:01 is strongly linked to this hypersensitivity syndrome. Recent guidelines have strongly recommended the screening of HLA-B*57:01 before initiation of abacavir containing therapy. To date, the precise mechanisms underlying this intolerance remain unrecognized, but recent publications offer new insights regarding the explanation for abacavir hypersensitivity. Our objective in this article is to provide a review of clinical manifestations, and risk factors and to focus attention on new published models for HLA-B*57:01-linked immune-mediated abacavir-induced hypersensitivity.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Les réactions d'hypersensibilité médicamenteuse sont un effet secondaire inattendu des traitements. Le diagnostic essentiellement clinique peut ne pas être évident dès lors qu'il apparaît sur un terrain déjà fragilisé, et l'arrêt tardif du traitement peut engendrer un risque vital pour le patient. Les réactions d'hypersensibilité à l'abacavir, thérapeutique anti-VIH, sont connues depuis plusieurs années. Parmi les facteurs de risque, un facteur génétique, tel que la présence de l'allèle HLA-B*57:01, a été établi. L'association significative entre l'allèle et la réaction d'hypersensibilité a conduit à mettre en place le dépistage systématique préthérapeutique de l'allèle incriminé, pour tout patient éligible pour un traitement par abacavir. Le mécanisme d'action de la réaction d'hypersensibilité est méconnu mais des publications récentes apportent déjà une réponse partielle au phénomène. Cet article se propose de faire un point sur l'hypersensibilité médicamenteuse à l'abacavir en détaillant les signes cliniques, les facteurs de risques et en présentant les différentes pistes explorées pour expliquer le mécanisme d'action.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Adresse e-mail : virginie.moalic@chu-brest.fr

L'hypersensibilité médicamenteuse est un effet indésirable, pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Des études immunogénétiques dans le domaine des manifestations allergiques médicamenteuses concernent essentiellement l'analyse de la région HLA située sur le chromosome 6 humain. Ces études ont permis d'identifier l'allèle HLA-B*57:01 comme marqueur génétique hautement prédictif de susceptibilité à l'hypersensibilité médicamenteuse liée à l'abacavir, molécule utilisée dans le traitement des patients infectés par le VIH. Des recommandations nationales et internationales ont d'ailleurs été émises afin de mettre en place un génotypage préthérapeutique du locus HLA-B des patients, permettant ainsi de réduire la survenue de réactions d'hypersensibilité liées au médicament.

Les signes cliniques de la réaction d'hypersensibilité

L'abacavir est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, qui a l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'infection par le VIH chez l'adulte. Dans les préparations médicamenteuses, on retrouve cette molécule seule ou associée à d'autres antirétroviraux. Cet inhibiteur nucléosidique est une option de premier choix pour les combinaisons de trithérapies utilisées chez les patients naïfs. Son utilisation peut être limitée car cette molécule peut être à l'origine de réactions d'hypersensibilité médicamenteuse survenant dans les six premières semaines de traitement chez 5 à 8 % des patients recevant cette thérapie anti-VIH [1]. Les symptômes sont les suivants : rashes cutanés, fièvre, léthargie, nausées, vomissements, diarrhées, dyspnée, troubles ostéo-musculaires, céphalées, paresthésies, œdèmes, défaillance hépatique ou rénale [2]. Ces troubles disparaissent dans les 72 heures après l'arrêt du traitement. Un arrêt trop tardif du médicament ou sa réintroduction peuvent entraîner des collapsus, engageant le pronostic vital dans 0,03 % des cas [3]. Les symptômes engendrés manquent cependant de spécificité et il n'est pas évident de faire la différence avec une infection concomitante, une réaction inflammatoire ou une réactivité vis-à-vis d'autres molécules médicamenteuses [1]. Le test épicutané (patch test) a été parfois utilisé pour confirmer une réaction d'hypersensibilité à l'abacavir [4]. L'utilisation de ce test en pratique courante ne revêt pas d'intérêt car il nécessite par définition une exposition antérieure à l'abacavir et les patients traités sont des patients naïfs pour ce traitement. D'une façon générale, le diagnostic d'hypersensibilité à l'abacavir est essentiellement clinique.

Les facteurs de risque de survenue d'une réaction d'hypersensibilité

L'allèle HLA-B*57:01 est associé à un risque majoré de réaction d'hypersensibilité à l'abacavir (OR : 117 ; IC à 95 % : 29–481) [2]. Deux premières publications ont décrit en 2002 l'association de l'allèle B*57:01 avec l'hypersensibilité médicamenteuse à l'abacavir [2,5]. Le lien a surtout été établi dans la population caucasioïde masculine VIH+. L'étude Predict-1 multicentrique randomisée en double insu,

regroupant 269 centres et 19 pays s'est intéressée à une cohorte de 1956 patients VIH+ n'ayant jamais reçu d'abacavir et étant d'origine caucasioïde. Deux groupes ont été réalisés : un groupe de patients bénéficiant d'un dépistage prospectif de l'allèle HLA-B*57:01, et dont les porteurs de l'allèle n'ont pas reçu le traitement ; un second groupe de patients traités sans dépistage prospectif de l'allèle incriminé. Au sein du premier groupe, le taux de réaction d'hypersensibilité est de 3,4 % chez les patients traités HLA-B*57:01 négatifs, tandis qu'il avoisine 7,8 % chez les patients non dépistés. Cette étude démontre donc l'utilité du génotypage du locus HLA-B des patients, avant le début du traitement, puisque cela permet de diminuer de 2,5 fois la survenue de réaction d'hypersensibilité chez les patients VIH+ [1]. De plus, au sein de cette étude, tous les patients avec un diagnostic clinique positif d'hypersensibilité à l'abacavir ont bénéficié d'un patch test. Ce dernier s'est avéré positif chez tous les patients porteurs de l'allèle HLA-B*57:01 [1]. D'autres études ont confirmé l'intérêt du génotypage HLA-B avant l'initiation du traitement au sein des populations australienne [6], française [7], canadienne [8] et américaine [9]. Des recommandations émises par l'HAS et la FDA recommandent d'ailleurs de mettre en place ce test génétique avant l'initialisation du traitement chez les patients. Dans les zones géographiques où la prévalence de l'allèle HLA-B*57:01 est faible, on peut se poser la question de l'intérêt du génotypage HLA, compte tenu du coût de l'analyse et du risque de survenue de réaction d'hypersensibilité. Cependant, il faut bien garder à l'esprit que même si le patient ne porte pas l'allèle HLA-B*57:01, il convient de mettre en place une surveillance clinique étroite pendant les premières semaines de traitement (une consultation tous les 15 jours), car des réactions d'hypersensibilité peuvent quand même survenir chez 3 % des patients VIH positifs HLA-B*57:01 négatifs [10]. Pour des réactions d'hypersensibilité médicamenteuse prouvée immunologiquement, la présence de l'allèle HLA-B*57:01 présente une valeur prédictive positive de 47,9 % et une valeur prédictive négative de 100 % [1]. Cependant, des patients HLA-B*57:01 ont toléré l'abacavir pendant six semaines sans réaction d'hypersensibilité sous-entendant ainsi que l'allèle est nécessaire mais non suffisant à la réaction [1]. D'autres facteurs génétiques pourraient intervenir. Des cas familiaux d'hypersensibilité à l'abacavir ont ainsi été décrits [11]. D'autres variants tels que HSP70-Hom M493T, qui code pour une protéine du choc thermique (HSP ou *heat shock protein*) et un polymorphisme situé dans le promoteur du gène *tumor necrosis factor alpha* (TNF alpha -238A) ont été incriminés [12,13]. La protéine HSP 70 pourrait intervenir comme protéine chaperonne pour router à l'intérieur d'une cellule présentatrice d'antigènes l'abacavir ou son métabolite vers la molécule HLA de classe I HLA-B*57:01, facilitant ainsi la présentation peptidique.

L'étude de Saag et al. [14] démontre que l'allèle B*57:01 a une sensibilité de 100 % dans la population présentant une réaction d'hypersensibilité à l'abacavir prouvée, aussi bien dans la population américaine blanche que noire, ce qui est controversé. L'origine ethnique des patients VIH+ semble importante, une relation hypersensibilité abacavir/HLA-B*57:01 ayant été trouvée dans les populations blanche et hispanique, mais pas dans la population

noire [15], ni dans les populations coréenne [16] ou taiwanaise [17].

Les différences au sein des populations s'expliquent aussi par la fréquence de l'allèle incriminé au sein de ces populations. Ainsi, elle varie de 3,5 % à 7,10 % pour la population caucasienne, de 1 % à 8,2 % dans la population asiatique et de 0,3 % à 3,2 % dans la population noire [18]. La plus faible prévalence de l'allèle HLA-B*57:01 dans la population noire peut expliquer le nombre réduit de réactions d'hypersensibilité chez les sujets VIH+ ayant cette origine ethnique. La prévalence de l'allèle HLA-B*57:01 au sein de la population VIH française calculée à partir de l'étude PEPI, incluant 2350 patients séropositifs, est de 5,32 % [19]. Cependant, cette prévalence varie au sein des régions, puisqu'elle n'est que de 1,1 % à la Martinique [20].

D'autres facteurs interviennent pour expliquer les phénomènes d'hypersensibilité à l'abacavir. Les patients VIH+ ayant un taux de lymphocytes CD8+ supérieur à 850/mm³ ont un risque plus élevé que les autres [21]. Le taux de lymphocytes CD4+ et la charge virale ne semblent pas jouer un rôle [22]. Lorsque l'abacavir est utilisé en association avec la nevirapine (inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, également à l'origine de réaction d'hypersensibilité), il existe une difficulté supplémentaire à identifier le médicament responsable [23].

Immunopathologie de l'hypersensibilité à l'abacavir

Le mécanisme d'hypersensibilité à l'abacavir est complexe. Il s'agit d'une manifestation d'hypersensibilité retardée (type IV de la classification de Gell et Coombs), avec un rôle central attribué aux lymphocytes T.

Pour rappel, les peptides classiquement présentés par les molécules HLA de classe I sont issus de la dégradation de protéines endogènes, synthétisées par la cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Les protéines sont dégradées dans le protéasome cytosolique en fragments peptidiques. La translocation des fragments peptidiques de leur site de production (cytosol) vers le site d'assemblage avec les molécules HLA de classe I (réticulum endoplasmique) nécessite l'intervention du transporteur *transporter associated with antigen processing* (TAP), ainsi que celle de protéines chaperonnes dont la tapasine. Après la liaison d'un peptide de bonne affinité, les molécules de classe I chargées en peptides sont libérées vers la surface de la CPA en passant par le réseau transgolgien. L'ensemble peptide-molécule HLA est reconnu par le TCR des lymphocytes T CD8+ et engendre ainsi une réponse immune cytotoxique [24].

D'une façon générale, les mécanismes d'hypersensibilité médicamenteuse font appel à différentes théories [25] :

- théorie de l'haptène-pro/haptène : les médicaments (haptène) ou leurs métabolites (pro-haptène) ont un faible poids moléculaire et doivent se lier de façon covalente à de plus grosses protéines endogènes pour devenir immunogènes. Il y a alors formation d'une protéine du soi altérée, qui sera dégradée en peptides de huit à dix acides aminés. Ce mécanisme nécessite l'intervention des cellules présentatrices d'antigènes, qui présentent le

complexe médicament-peptide via les molécules HLA de classe I et/ou II aux lymphocytes T ;

- concept pi ou interaction pharmacologique avec un récepteur immunitaire : le médicament interagit directement par des liaisons non covalentes avec un récepteur des lymphocytes T ou une molécule HLA, sans forcément qu'il y ait présentation peptidique par la molécule HLA. Le médicament réalise un pontage entre le TCR et le complexe peptide-HLA, ce qui augmente l'affinité du TCR pour son ligand.

Ces modèles ne peuvent cependant pas expliquer entièrement le mécanisme d'hypersensibilité à l'abacavir. Plusieurs études ont vu le jour pour expliquer ce mécanisme d'action qui s'avère plus complexe.

L'abacavir ou son métabolite en se liant à une plus grosse molécule se comporterait comme un haptène, qui serait ensuite chargé dans le sillon de présentation peptidique de la molécule HLA-B*57:01. Chessman et al. ont rapporté que le mécanisme est TAP- et tapasine-dépendant [26]. D'autres études ont émis des hypothèses pour expliquer la restriction abacavir-HLA-B*57:01. Les molécules HLA de classe I ont une structure telle qu'elles présentent un site de fixation peptidique constitué des deux domaines alpha 1 et alpha 2 de la chaîne lourde alpha. Le présentoir peptidique ainsi formé a la forme d'un sillon, ouvert aux deux extrémités et permettant le chargement de peptides d'environ neuf acides aminés. Les acides aminés ainsi engagés présentent, par leur taille et leur charge, une spécificité de liaison peptidique et une spécificité de reconnaissance par les TCR des lymphocytes T CD8+. Le sillon peptidique est découpé en six poches (A à F). Ces poches constituent des points d'ancrage pour le peptide [27]. Dans l'étude de Chessman et al., des cellules présentatrices d'antigènes portant les molécules HLA-B*58:01, HLA-B*57:02 ou HLA-B*57:03 sont incapables d'activer les lymphocytes T CD8+ en présence d'abacavir [26]. HLA-B*58:01 diffère de HLA-B*57:01 par l'intermédiaire des résidus 97 et 103, ainsi que par les résidus 45 et 46, qui correspondent aux positions d'ancrage des peptides dans la poche B de la molécule HLA. La molécule HLA-B*57:02 diffère de HLA-B*57:01 par l'intermédiaire des résidus en position 156, 114 et 116, les deux derniers résidus correspondant aux positions d'ancrage des peptides dans la poche F de la molécule HLA. L'absence de réponse par les lymphocytes T CD8+ lorsque les patients sont porteurs de l'allèle HLA-B*58:01 et/ou HLA-B*57:02 suggère que soit le peptide est présenté dans une conformation altérée, soit il n'est pas présenté par le changement de structure chimique dans le sillon de présentation de la molécule HLA. La molécule HLA-B*57:03 diffère de HLA-B*57:01 par l'intermédiaire des résidus en position 114 et 116. Les patients HLA-B*57:03 ne semblent pas sujets à des réactions d'hypersensibilité, suggérant l'importance de deux résidus d'ancrage de la poche F. Des molécules HLA-B*57:03 modifiées ont été créées : une avec une substitution 114 Asp→Asn et une avec une substitution 116 Ser→Tyr. Ce changement crucial d'un seul acide aminé abroge totalement la capacité de l'abacavir ou de son métabolite à déclencher une réponse T CD8+ spécifique [26,28].

La liaison non covalente de l'abacavir à la molécule HLA-B*57:01 altère le répertoire peptidique présenté par la

molécule HLA-B*57:01. Deux équipes ont réalisé des études cristallographiques du complexe HLA-abacavir-peptide, soit par l'intermédiaire d'un peptide endogène [29], soit par l'intermédiaire d'un peptide synthétique [28]. Les peptides qui se lient aux molécules HLA-B*57:01 sont des peptides de neuf acides aminés, avec en position C-terminale un tryptophane ou une phénylalanine se liant dans la poche F. En présence d'abacavir, les peptides chargés sur la molécule HLA-B*57:01 possèdent des acides aminés plus petits en position 9 (valine, leucine, ou isoleucine). L'abacavir change donc le « soi » des fragments peptidiques présentés [26,28–31]. Illing et al. ont étudié le répertoire des peptides présentés en mettant en culture des cellules présentant la molécule HLA-B*57:01 en présence ou en absence d'abacavir. En présence d'abacavir, jusqu'à 25% des peptides élués des molécules HLA sont des nouveaux peptides, phénomène non retrouvé si l'abacavir est absent [29,32].

Adam et al. montrent que la fixation de l'abacavir à une molécule HLA-B*57:01 permet de stabiliser les molécules HLA à la surface cellulaire et que 40% des clones T activés spécifiquement par l'abacavir réagissent très rapidement (2 à 5 min) en présence du médicament. Cette réactivité est trop rapide, suggérant que les clones T reconnaissent l'abacavir lui-même et non pas un peptide altéré [33]. De plus, la réactivité des clones T vis-à-vis de l'abacavir est hétérogène et semble fonction de l'avidité des TCR pour le médicament, de la concentration du médicament dans le milieu réactionnel et est proportionnelle à la densité antigénique des molécules HLA-B*57:01 à la surface des CPA [34].

En résumé, les données suivantes ont été établies pour expliquer le mécanisme d'action d'hypersensibilité à l'abacavir :

- l'hypersensibilité à l'abacavir est restreinte à la molécule de classe I HLA-B*57:01 ;
- le chargement du peptide au sein de la molécule HLA-B*57:01 est TAP/Tapasine-dépendant ;
- la réaction d'hypersensibilité est médiée par l'intermédiaire d'une réponse T CD8+ spécifique ;
- la poche F de la molécule HLA-B*57:01 joue un rôle crucial dans la fixation du peptide, surtout le résidu d'ancrage en position 116 ;
- la fixation de l'abacavir sur la molécule HLA entraîne un changement des peptides chargés, créant des peptides altérés, qui présentent des acides aminés plus petits en position 9 C-terminale (théorie des peptides altérés, qui ne sont plus reconnus comme peptides du « soi ») [30].

La détermination de l'allèle HLA-B*57:01, par son association forte avec les réactions d'hypersensibilité dues à l'abacavir, est désormais passée en test de routine, avant la première prescription de cette molécule chez les patients VIH positifs. Ce dépistage préthérapeutique systématique a permis de diminuer de façon importante la survenue de cet effet indésirable potentiellement mortel. Il s'agit sans doute là d'une première étape de la pharmacogénétique, discipline du futur, qui permettra d'adapter les thérapeutiques au profil génétique des patients.

Les interrogations concernant le mécanisme d'action d'hypersensibilité à l'abacavir ne sont pas toutes levées. Une meilleure compréhension de ce mécanisme est

importante car il permettrait d'apporter de nouvelles pistes à la fois dans la compréhension des autres réactions d'hypersensibilité médicamenteuse, mais aussi dans celles concernant la survenue de maladies auto-immunes.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Mallal S, Phillips E, Carosi G, Molina JM, Workman C, Tomazic J, et al. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to abacavir. *N Engl J Med* 2008;358:568–79.
- [2] Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet* 2002;359:727–32.
- [3] Hetherington S, McGuirk S, Powell G, Cutrell A, Naderer O, Spreen B, et al. Hypersensitivity reactions during therapy with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor abacavir. *Clin Ther* 2001;23:1603–14.
- [4] Giorgini S, Martinelli C, Tognetti L, Carocci A, Giuntini R, Mastronardi V, et al. Genetics and the potential for predictive tests in adverse drug reactions. *Dermatol Ther* 2011;24:591–4.
- [5] Hetherington S, Hughes AR, Mosteller M, Shortino D, Baker KL, Spreen W, et al. Genetic variations in HLA-B region and hypersensitivity reactions to abacavir. *Lancet* 2002;359:1121–2.
- [6] Rauch A, Nolan D, Martin A, McKinnon E, Almeida C, Mallal S. Prospective genetic screening decreases the incidence of abacavir hypersensitivity reactions in the Western Australian HIV cohort study. *Clin Infect Dis* 2006;43:99–1020.
- [7] Zucman D, Truchis P, Majerholc C, Stegman S, Caillat-Zucman S. Prospective screening for human leukocyte antigen-B*5701 avoids abacavir hypersensitivity reaction in the ethnically mixed French HIV population. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:1–3.
- [8] Berka N, Gill JM, Liacini A, O'Bryan T, Khan FM. Human leukocyte antigen (HLA) and pharmacogenetics: screening for HLA-B*57:01 among human immunodeficiency virus-positive patients from southern Alberta. *Hum Immunol* 2012;73:164–7.
- [9] Young B, Squires K, Patel P, Dejesus E, Bellos N, Berger D, et al. First large, multicenter, open-label study utilizing HLA-B*5701 screening for abacavir hypersensitivity in North America. *AIDS* 2008;22:1673–5.
- [10] Martin MA, Klein TE, Dong BJ, Pirmohamed M, Haas DW, Kroetz DL. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for HLA-B genotype and abacavir dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:734–8.
- [11] Peyriere H, Nicolas J, Siffert M, Demoly P, Hillaire-Buys D, Reynes J. Hypersensitivity related to abacavir in two members of a family. *Ann Pharmacother* 2001;35:1291–2.
- [12] Martin AM, Nolan D, Gaudieri S, Almeida CA, Nolan R, James I, et al. Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4180–5.
- [13] Martin AM, Almeida CA, Cameron P, Purcell AW, Nolan D, James I, et al. Immune responses to abacavir in antigen-presenting cells from hypersensitive patients. *AIDS* 2007;21:1233–44.
- [14] Saag M, Balu R, Phillips E, Brachman P, Martorell C, Burman W, et al. High sensitivity of human leukocyte antigen-B*5701 as a marker for immunologically confirmed abacavir hypersensitivity in white and black patients. *Clin Infect Dis* 2008;46:1111–8.

- [15] Hughes AR, Mosteller M, Bansal AT, Davies K, Haneline SA, Lai EH, et al. Association of genetic variations in HLA-B region with hypersensitivity to abacavir in some, but not all, populations. *Pharmacogenomics* 2004;5:203–11.
- [16] Park WB, Choe PG, Song KH, Lee S, Jang HC, Jeon JH, et al. Should HLA-B*5701 screening be performed in every ethnic group before starting abacavir? *Clin Infect Dis* 2009;48:365–7.
- [17] Sun HY, Hung CC, Lin PH, Chang SF, Yang CY, Chang SY, et al. Incidence of abacavir hypersensitivity and its relationship with HLA-B*5701 in HIV-infected patients in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:599–604.
- [18] Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acid Res* 2011;39:D913–9.
- [19] Molina JM, Pialoux G, Raffi F, Force G, Girard PM, Verdon R, et al. A prospective epidemiological study to determine the prevalence of HLA-B* 5701 in French HIV-1 infected patients: PEPI study. In: 11th European AIDS conference. 2007.
- [20] Abel S, Paturol L, Cabié A. Abacavir hypersensitivity. *N Engl J Med* 2008;358:2515.
- [21] Easterbrook PJ, Waters A, Murad S, Ives N, Taylor C, King D, et al. Epidemiological risk factors for hypersensitivity reactions to abacavir. *HIV Med* 2003;4:321–4.
- [22] Chirouze C, Hustache-Mathieu L, Rougeot C, Drobacheff C, Gil H, Faller JP, et al. Risk factors for Abacavir-induced hypersensitivity syndrome in the "real world". *Pathol Biol* 2004;52:529–33.
- [23] Tiozzi V. Pharmacogenetics of antiretrovirals. *Antiviral Res* 2010;85:190–200.
- [24] Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 2005;207:145–57.
- [25] Llano A, Brander C. Mechanisms involved in the Abacavir-mediated hypersensitivity syndrome. *Cell Res* 2012, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2012.105>.
- [26] Chessman D, Kostenko L, Lethborg T, Purcell AW, Williamson NA, Chen Z, et al. Human leukocyte antigen class I-restricted activation of CD8+ T cells provides the immunogenetic basis of systemic drug hypersensitivity. *Immunity* 2008;28:822–32.
- [27] Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997;89:167–210.
- [28] Ostrov DA, Grant BJ, Pompeu YA, Sidney J, Harndahl M, Southwood S, et al. Drug hypersensitivity caused by alteration of the MHC-presented self-peptide repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:9959–64.
- [29] Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, Kostenko L, Chen Z, Bharadwaj M, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 2012;486:554–8.
- [30] Yun J, Adam J, Yerly D, Pichler WJ. Human leukocyte antigens (HLA) associated drug hypersensitivity: consequences of drug binding to HLA. *Allergy* 2012;67:1338–46.
- [31] Norcross MA, Luo S, Lu L, Boyne MT, Gomarteli M, Renfels AD. Abacavir induces loading of novel self-peptides into HLA-B*57:01: an autoimmune model for HLA-associated drug hypersensitivity. *AIDS* 2012;26:F21–9.
- [32] Illing PT, Vivian JP, Purcell AW, Rossjohn J, McCluskey J. Human leukocyte antigen-associated drug hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* 2012;25:1–9.
- [33] Adam J, Werner WJ, Yerly D. Delayed drug hypersensitivity: models of T-cell stimulation. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71:701–7.
- [34] Adam J, Eriksson KK, Schnyder B, Fontana S, Pichler WJ, Yerly D. Avidity determines T-cell reactivity in abacavir hypersensitivity. *Eur J Immunol* 2012;42:1706–16.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



TECHNIQUES AU QUOTIDIEN

Évaluation de l'automate d'hématologie Sysmex XN-2000[®] pour une utilisation en routine : comparaison avec l'Advia 2120i[®]

Evaluation of the fully automated hematology analyzer Sysmex XN-2000[®] in a routine laboratory: Comparison with the Advia 2120i[®]

V.T.P. Nguyen^{a,*}, P. Vancles^b, L. Rozen^a, D. Noubouossie^a, A. Demulder^a

^a Laboratory of hematology and haemostasis, CHU Brugmann, ULB, 4, place Arthur-Van-Gehuchten, 1020 Bruxelles, Belgique

^b Haute école provinciale de Hainaut-Condorcet, 7330 St-Ghislain, Belgique

Reçu le 27 novembre 2012 ; accepté le 19 décembre 2012

KEYWORDS

Automated
hematology
analyzers;
Sysmex XN;
Advia 2120i

MOTS CLÉS

Analyseurs
automatisés
d'hématologie ;

Summary The aim of this study is to evaluate the analytical performance of the new Sysmex XN-2000[®] analyzer in our routine laboratory. Overall, 798 adult and 340 pediatric blood samples were analyzed during a period of 3 weeks on the Sysmex XN-2000[®] and Advia 2120i[®] as well as 100 body fluids. Analytical parameters as within-run and inter-day precisions, carry-over, linearity, limit of quantification, stability are excellent for the complete blood count (CBC) and correlation with Advia results shows high concordance between most parameters, except for the monocytes counts which are systematically higher with the Sysmex XN-2000[®]. The body fluids module shows high precision (CV < 10%) for WBC with negligible carry-over and excellent linearity. However, the BF module cannot give a number of RBC below 1000 μL . RBC results are only provided in interval of $10^3/\mu\text{L}$ cells with no intermediate counts. We concluded that the Sysmex XN-2000 provides highly reliable results. However, in our view, improvement of RBC count is mandatory and impairs full-automated counts of this kind of samples.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé Le but de cette étude est l'évaluation des performances analytiques du nouveau Sysmex XN 2000[®] (Sysmex, Japon) au laboratoire de routine. Au total, 798 échantillons sanguins adultes et 340 pédiatriques ont été analysés en parallèle sur le Sysmex XN-2000[®] et sur l'Advia 2120i[®] (Siemens, Allemagne), ainsi que 100 liquides biologique. Notre évaluation a porté sur les précisions intra-jour et inter-jour, le degré de contamination, la linéarité et la limite de quantification avec des résultats excellents pour tous les paramètres de l'héogramme. La

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : vothang@ulb.ac.be, phuongnguyen0686@gmail.com (V.T.P. Nguyen).

Sysmex XN ;
Advia 2120i

comparaison avec l'appareil Advia 2120i® montre une absence de biais pour tous les paramètres analysés, à l'exception du comptage des monocytes qui est plus élevé avec le Sysmex XN-2000®. Le module d'analyse des liquides biologiques (BF) montre également une grande performance en termes de précision, de contamination et de linéarité pour les comptages des leucocytes et des érythrocytes (GR). Toutefois, ce module manque de sensibilité pour des valeurs inférieures à 1000 GR/ μ L et il est impossible d'avoir des valeurs intermédiaires de GR, l'appareil les dénombrant uniquement par tranche de 1000 GR/ μ L. En conclusion, le Sysmex XN-2000® fournit des résultats fiables. Cependant, à notre point de vue, l'amélioration du comptage des GR dans les liquides est une condition indispensable.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Introduction

La fusion des laboratoires en grand ensemble impose une automatisation de plus en plus poussée et des délais de réponses de plus en plus courts, tout en maintenant la qualité dans le rendu de résultats. L'analyseur modulaire de Sysmex, récemment mis sur le marché [1] représente un type de réponse à ces nouvelles exigences. En effet, cette série XN se compose de plusieurs modules, permettant une combinaison flexible, selon les besoins du laboratoire, de plusieurs analyseurs combinés à un système pré-analytiques de tri et transport d'échantillons, ainsi que l'étalement et la coloration automatique des frottis sanguins [1,2].

Les paramètres érythrocytaires et le comptage par impédance des plaquettes sont mesurés de la même manière que sur les analyseurs Sysmex précédents, comme ceux de la série XE [3,4]. Les nouveautés apportées par la série XN est l'introduction de quatre nouveaux canaux basés sur la technique de cytométrie en flux avec fluorescence : un canal pour les cellules nucléées (WNR : *white cell nucleated channel*) ; un canal pour la formule leucocytaire (WDF : *white cell differential channel*) ; un canal de détection de cellules précurseurs (WPC : *white cell precursor channel*) et un canal de comptage des plaquettes par fluorescence (PLT-F). Parmi les autres innovations, citons également que le comptage des érythroblastes (NRBC) est effectué sur tous les échantillons pour lesquels une formule leucocytaire est demandée. La séparation des lymphocytes et les monocytes a aussi été optimisée dans le canal WDF grâce à un nouveau réactif de perforation. L'impédance n'est plus utilisée pour compter les globules blancs (GB).

Le canal WPC n'est utilisé que comme test réflexe permettant de distinguer les blastes des lymphocytes anormaux. Le canal PLT-F peut être sélectionné manuellement mais il se déclenche aussi automatiquement comme test réflexe en cas d'anomalie des GR, de l'histogramme de taille des plaquettes et si le nombre de plaquettes est inférieur à une limite préalablement déterminée par l'utilisateur. Ce canal PLT-F utilise un nouveau colorant ARN permettant également de quantifier l'IPF (fraction des plaquettes immatures) [5,6].

Une innovation supplémentaire est l'introduction du mode *low WBC* permettant de réaliser la formule avec une plus grande précision sur les échantillons leucopéniques (< 500 GB/ μ L). La formule est alors réalisée sur un volume trois fois plus important de l'échantillon préalablement dilué. L'appareil comprend également un mode liquide biologique (BF : *body fluid*) permettant de réaliser la cytologie

sur différents liquides. Ce mode BF était déjà disponible sur le précédent appareil Sysmex XE-5000 [7–9].

Le but de notre étude était d'évaluer en routine les performances analytiques de ce nouvel automate d'hématologie Sysmex XN-2000®, y compris le module BF, en termes de précision, du degré de contamination, de la linéarité, d'exactitude et de stabilité des paramètres au cours du temps en comparaison avec l'Advia 2120i®. Le gain en termes de vérifications microscopiques manuelles est également évalué.

Patients et méthodes

Patients

Au total, 798 échantillons de sujets adultes et 340 échantillons pédiatriques prélevés sur tubes K₂EDTA ont été évalués en parallèle sur le Sysmex XN-2000® et l'Advia 2120i®. Les comparaisons ont été établies en considérant l'Advia comme appareil de référence. Ces échantillons proviennent des patients hospitalisés et ambulatoires qui arrivent quotidiennement au laboratoire. Ces échantillons représentent une grande gamme d'échantillons normaux et pathologiques.

Pour l'évaluation du module BF, nous avons utilisé 100 liquides d'origines diverses (liquide céphalorachidien – LCR, liquides synoviaux, péricrâniens, pleuraux, dialysat). Dans ce cas précis, le comptage manuel était utilisé comme méthode de référence.

Principe de mesures sur XN-2000

Le système optique sur XN-2000 utilise un laser diode rouge stable produisant un faisceau lumineux de longueur d'onde de 633 nm et utilise la polyméthine comme principal colorant fluorescent. La mesure des plaquettes par fluorescence et de l'IPF se fait grâce à un autre colorant fluorescent dérivé de l'oxazine. Trois signaux sont produits :

- lumière diffractée à petit angle (FSC : *forward scattered light*), fournissant des informations sur la taille des cellules ;
- lumière diffractée à grand angle (SSC : *side scattered light*), fournissant des informations sur la structure cellulaire interne ;
- la fluorescence émise (SFL : *side fluorescent light*), dont l'intensité fournit des informations sur le contenu en ADN/ARN.

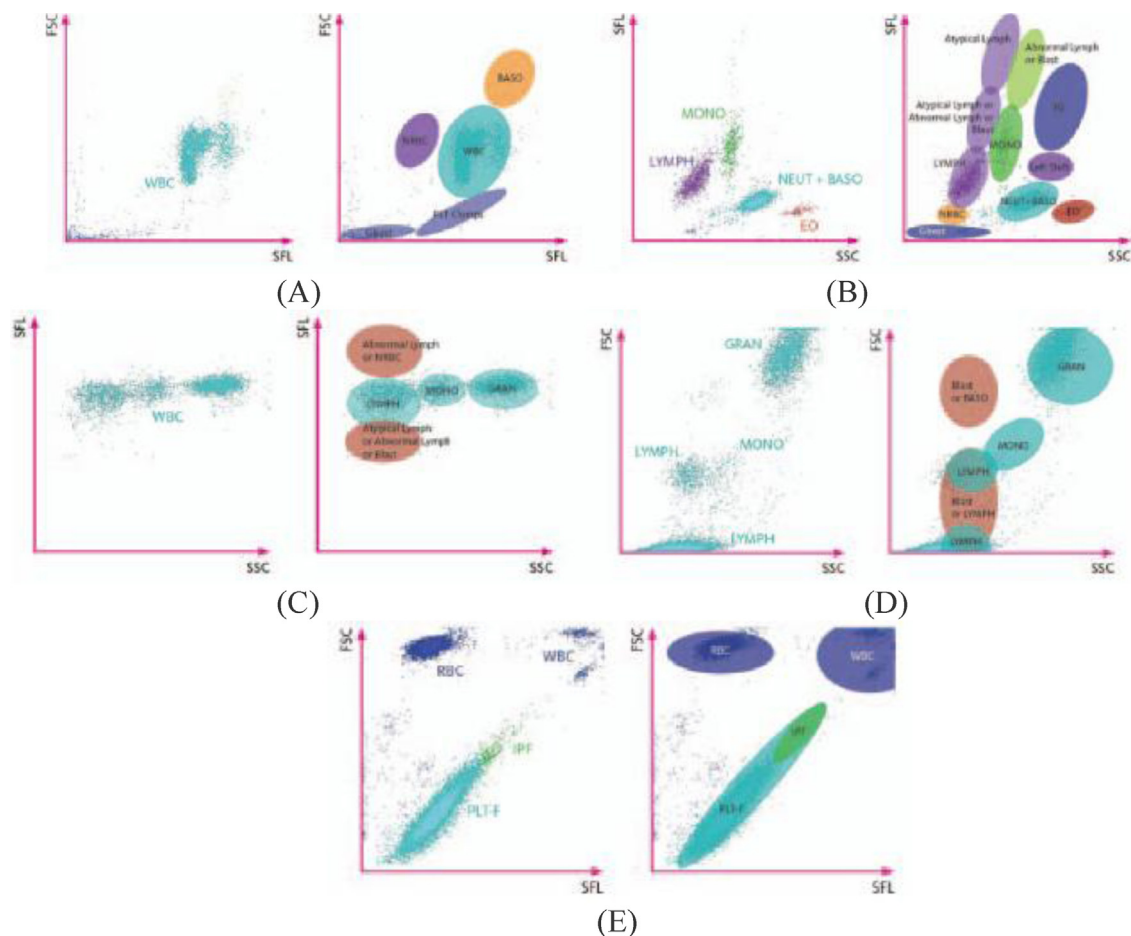


Figure 1 (A) Le scattergramme du canal WNR montrant les zones de globules blancs (WBC), de basophiles (BASO), d'érythroblastes (NRBC) et des amas de plaquettes (platelet clumps). (B) Le scattergramme du canal WDF montrant les zones des neutrophiles+basophiles (NEUT + BASO), des lymphocytes (LYMPH), des monocytes (MONO), des éosinophiles (EO), des granulocytes immatures (IG) et des NRBC. Les positions des lymphocytes réactionnels, blastes ou lymphocytes anormaux sont également indiquées. (C) Le scattergramme du canal WPC montrant les zones des lymphocytes atypiques, des lymphocytes anormaux, des NRBC, des granulocytes, des monocytes et des blastes. SSC est sur l'axe x et SFL sur l'axe y. (D) Le scattergramme du canal WPC avec SSC sur l'axe x et FSC sur l'axe y. (E) Le scattergramme du canal des plaquettes fluorescentes (PLT-F) montrant la zone des plaquettes (PLT-F), IPF, WBC et globules rouges.

Le marquage fluorescent des cellules a lieu après la perforation de membrane cellulaire provoquée par des réactifs de lyse spécifiques. Grâce à la perforation membranaire, le colorant polyméthine (ou l'oxazine pour les plaquettes) entre dans la cellule et se lie à l'acide nucléique ainsi qu'aux protéines bioréactives dans les organites cytoplasmiques. Ces méthodes sont employées dans les quatre nouveaux canaux qui sont : WNR, WDF, WPC et PLT-F (Fig. 1) ainsi que dans le canal réticulocytes (RET) déjà présent sur les précédents appareils Sysmex. Le comptage des globules rouges et des plaquettes se base sur les principes d'impédance. Les autres paramètres érythrocytaires sont obtenus par une combinaison de mesures optique et d'impédance sans avoir recours à une sphérisation préalable.

Principe de mesures sur l'Advia 2120i®

Les leucocytes sont comptés et analysés sur deux canaux, peroxydase et basophile, après la lyse des globules rouges.

Le canal peroxydase est un canal optique qui réalise la numération des GB totaux ainsi que le compte différentiel sur base d'un diagramme taille/intensité de coloration à la peroxydase. Le compte différentiel est livré en cinq populations : neutrophiles, lymphocytes, monocytes, éosinophiles et « grandes cellules non identifiées-peroxydase négatives » (LUC : *large unidentified cells*) (qui regroupe blastes, lymphocytes réactionnels, atypiques, grands monocytes). Le canal baso réalise également la mesure des GB totaux par un canal laser après immersion des cellules dans un réactif de perforation auquel les basophiles résistent, ce qui permet leur numération. Ce canal réalise également l'analyse des noyaux des GB en les répartissant en cellules mononucléées (MN) (lymphocytes, monocytes, granulocytes immatures, et blastes) et cellules polymorphonucléaires (PMN) (neutrophiles et éosinophiles) [10]. Les érythroblastes sont également identifiés dans ce canal.

Après une sphérisation isovolumétrique des globules rouges, les globules rouges et les plaquettes sont comptés. Leur taille est mesurée lors de leur passage individuel devant

un faisceau de lumière laser monochromatique. La lumière diffractée est mesurée simultanément sous deux angles, celle à petit angle étant indicative du volume cellulaire et celle de grand angle indiquant l'indice de réfraction reflétant la concentration interne en hémoglobine des globules rouges [10].

Calibration et contrôle de qualité

L'Advia 2120i® et le Sysmex XN-2000® ont été calibrés par le fournisseur. Les contrôles de qualité des fabricants sont analysés tous les jours en début et en fin de journée.

Validation de l'appareil Sysmex XN-2000®

Précision

La précision intra-jour a été évaluée pour plusieurs paramètres de l'hémogramme (GR, GB, concentration en hémoglobine, hématocrite, réticulocytes, NRBC et formule leucocytaire : neutrophiles, lymphocytes et monocytes) et pour le comptage des GR et GB dans les liquides biologiques en répétant 20 fois l'analyse des échantillons de patients avec des valeurs pathologiques basses, normales et pathologiques hautes.

La précision inter-jour a été évaluée pour les mêmes paramètres avec les trois niveaux de contrôles internes fournis par le fabricant pendant 20 jours.

Degré de contamination

Un échantillon avec un nombre élevé d'éléments cellulaires (H1, H2, H3) est mesuré trois fois, suivi par trois mesures d'un échantillon de faible valeur cellulaire (L1, L2, L3). Le taux de contamination est calculé suivant la formule : $([L1 - L3]/[H3 - L3]) \times 100\%$ comme recommandé par l'ICSH [11]. Ce taux est évalué pour les paramètres de comptage : GB, GR, PLT, Hb de l'hémogramme et GR, GB dans les liquides biologiques.

Linéarité

La linéarité a été évaluée en utilisant un échantillon avec des valeurs de comptage cellulaire élevées. Cet échantillon était dilué plusieurs fois avec le diluant *Cell Pack DCL* fourni par le fabricant Sysmex pour obtenir des comptes proportionnellement plus bas. Chaque diluant est analysé en duplicat, la moyenne étant portée en graphique par rapport à la valeur attendue. La linéarité a été évaluée pour les GB, GR, Hb, Hct, Plt de l'hémogramme et pour le comptage des GB et GR dans les liquides biologiques.

Limite de quantification

La limite de quantification a été évaluée pour la numération des GR, GB et PLT dans l'hémogramme ainsi que pour le comptage des GB et GR dans les liquides en répétant dix fois l'analyse pour chaque niveau de dilution d'un échantillon. Cette limite correspond à la plus petite concentration pour laquelle le coefficient de variation (CV) ne dépasse pas 10 %.

Stabilité

La stabilité est évaluée pour tous les paramètres de l'hémogramme mesurés. Une rangée de dix échantillons

choisis au hasard est analysée à 0 h, 4 h, 8 h, 24 h puis 48 h. Ces échantillons sont conservés à température ambiante pendant la première journée de travail puis à 4 °C pour les jours suivants. Ils sont conditionnés à température ambiante pendant au moins 30 minutes avant l'analyse.

Exactitude

Tous les échantillons sont analysés en double, sur l'Advia 2120i® puis sur le Sysmex XN-2000. Neuf paramètres ont été étudiés : GB, GR, Hb, Hct, plaquettes, réticulocytes, nombre en valeur absolue des polynucléaires neutrophiles, lymphocytes et monocytes. La numération des granulocytes immatures et des NRBC est comparée avec le comptage manuel. Nous utilisons la méthode de Bland-Altman pour cette comparaison.

Évaluation des alarmes

La performance des alarmes des deux analyseurs a été évaluée en utilisant les critères de revue équivalents pour les deux appareils (Tableau 1). Leur spécificité est évaluée en utilisant comme référence le comptage microscopique manuel. Les nombres de revue selon ces critères sont comparés entre les deux analyseurs. Les critères de revue sont repris dans le Tableau 1.

Analyses statistiques

La comparaison de Bland-Altman entre les résultats de Sysmex et de l'Advia a été réalisée en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 4. Pour la comparaison de la spécificité des alarmes entre deux appareils, nous avons utilisé le test z de comparaison de deux proportions à l'aide du logiciel Statistix version 9.

Tableau 1 Critères de revue de lame utilisés dans notre étude sur l'Advia 2120i® et sur Sysmex XN-2000.

	Advia	Sysmex
Critères quantitatifs	Leucopénie < 3000/μL	
	Leucocytose > 25 000/μL	
	Hématocrite < 25 %	
	Plaquettes < 100 000/μL	
Critères qualitatifs	Lymphocytose > 4000/μL	
	Amas de plaquettes (platelet clumps)	
	LUC > 4,5 %	
	Ig ++ ou +++	Ig > 5 %
	Atyp +, ++ ou +++	Abn/Atyp Lymph
	Blasts +, ++ ou +++	Blasts
	NRBC > 5 %	

LUC : grandes cellules non identifiées-peroxydase négative (*Large Unidentified Cells*) ; Ig : granulocytes immatures ; Atyp : lymphocytes atypiques ; Abn : lymphocytes anormaux ; NRBC : érythroblastes.

Tableau 2 Précisions intra- et inter-jour ($n=20$) pour les différents paramètres de l'hémogramme.

	Niveaux	GB	GR	Hb	Hct	PLT	NEUT	LYMPH	MONO	RET	NRBC
Précision intra-jour CV%	Anormal bas	0,96	0,6	0,45	0,74	2,07	3,2	4,84	9,62	5,31	4,92
	Normal	2,3	0,69	0,63	0,71	2,54	1,71	1,9	4,91	1,45	3,11
	Anormal élevé	1,29	0,56	0,54	0,68	1,66	1,44	1,52	3,26		
Précision inter-jour CV%	Anormal bas	2,15	0,86	1,12	1,31	7,26	3,48	4,26	8,63	5,56	8,91
	Normal	1,26	0,86	0,69	1,2	2,56	2,22	3,03	5,98	3,6	5,9
	Anormal élevé	1,15	0,61	0,59	1,37	1,57	1,98	2,88	5,45	7,13	3,93

GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; Hb : taux d'hémoglobine ; Hct : hématocrite ; PLT : plaquettes ; NEUT : neutrophiles ; LYMPH : lymphocytes ; MONO : monocytes ; RET : réticulocytes ; NRBC : érythroblastes.

Tableau 3 Évaluation de la linéarité.

	Pente	Intersection	r^2
GB	1,00	0,22	1,00
Hb	1,00	0,15	1,00
GR	1,00	0,05	1,00
Hct	1,00	0,71	0,99
PLT	0,99	3,10	1,00

GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; Hb : taux d'hémoglobine ; PLT : plaquettes ; Hct : hématocrite.

Résultats

Les précisions intra-jour et inter-jour sur trois niveaux différents montrent un faible coefficient de variation ($CV < 10\%$) pour tous les paramètres de l'hémogramme, y compris le comptage des NRBC et des réticulocytes (Tableau 2). La contamination est négligeable pour GR, Hb, GB et PLT, les résultats sont tous inférieurs à la limite recommandée de 2%. La linéarité est excellente pour les GB, GR et PLT (Tableau 3) avec des limites de quantification respectivement de 140, 189,10³ et 7,10³ éléments/ μ L. La stabilité à 48 heures à 4°C, a montré qu'il y avait une augmentation du volume corpusculaire moyen (MCV) (jusqu'à 5 fL) après 24 heures sans aucune variation significative de l'hématocrite (Fig. 2). Les autres paramètres mesurés sont stables. L'analyse des résultats selon la comparaison de Bland-Altman avec l'Advia 2120i® ne montre pas de biais

significatif pour la plupart des paramètres, à l'exception du comptage des monocytes qui est systématiquement plus élevé avec le Sysmex XN-2000® (Tableau 4). Le comptage des granulocytes immatures (IG) est effectué par l'appareil Sysmex alors que ce nombre n'est pas disponible sur l'Advia. Les résultats NRBC et des IG donnés par Sysmex montrent une bonne corrélation avec le comptage manuel (Tableau 4). Le nombre de revues est plus faible avec Sysmex XN-2000 par rapport à l'Advia 2120i, respectivement 16,5 et 20,2% ($p=0,0073$), la spécificité de l'alarme « blast » (99% vs 91%, $p < 0,001$) de l'alarme « IG » (99,6% vs 97,8%, $p=0,018$) et de toutes les alarmes (82% vs 92%, $p < 0,001$) étant plus élevée pour Sysmex (Tableau 5). L'analyse complète de dix échantillons en mode automatique sur Sysmex XN-2000 permet de gagner trois à quatre minutes par rapport à l'Advia 2120i. Le mode BF montre un CV entre 2 et 11% pour les précisions intra- et inter-jour sur différents types de liquide et les précisions inter-jour pour le comptage des GB et GR (Tableau 6). La contamination est négligeable (0%) et la linéarité est bonne (Pente = 1, $R^2 \geq 0,99$). Les limites de quantification sont respectivement de 100 et 6000 éléments/ μ L. Une bonne corrélation avec la méthode manuelle est observée pour la numération leucocytaire (R^2 de 0,94) et leur différenciation entre cellules polynucléées et mononucléées. Toutefois, ce mode BF manque de sensibilité pour des valeurs inférieures à 1000 GR/ μ L et il est impossible d'avoir des valeurs intermédiaires entre les unités de 10³ GR/ μ L.

Discussion

Aspects quantitatifs

L'étude des performances analytiques du Sysmex XN 2000® réalisées selon les recommandations du Comité international pour l'évaluation d'automates d'hématologie [11] s'est révélée satisfaisante. En effet, les précisions intra- et inter-jour offrent de bons résultats pour les numérations des leucocytes et des plaquettes, et pour les paramètres érythrocytaires quel que soit le niveau de valeur testée. La linéarité des numérations leucocytaire, plaquettaire et érythrocytaire est excellente et la contamination entre les échantillons successifs est absente. La comparaison selon Bland-Altman avec l'appareil Advia 2120i® montre une absence de biais significatif pour tous les paramètres analysés, à l'exception du comptage des monocytes qui

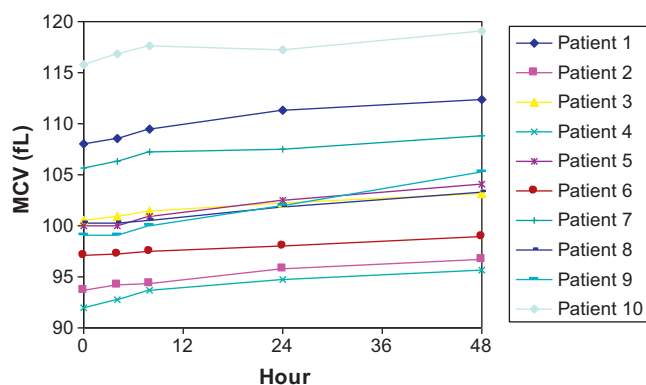


Figure 2 La stabilité du volume corpusculaire moyen durant 48 h sur Sysmex XN-2000.

Tableau 4 Comparaison de Bland-Altman Sysmex XN-2000 vs Advia 2120i.

	<i>n</i>	Biais (%)	Intervalle de confiance 95 %
GR	1138	-3,78	(-8,20;0,64)
Retic	135	-52,04	(-113,2;9,12)
Hb	1138	-1,04	(-5,40;3,31)
Hct	1138	0,81	(-9,18;10,81)
PLT	1138	-10,24	(-32,06;11,57)
GB	1138	1,06	(-8,56;10,68)
NEUT	1138	-3,21	(-12,77;6,34)
LYM	1138	1,97	(-11,88;15,83)
MONO	1138	33,48	(0,71;66,26)
NRBC (vs comptage manuel)	25	-2,21	(-9,8;5,3)
Ig (vs comptage manuel)	45	-1,91	(-10,8;7,0)

GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; Hb : taux d'hémoglobine ; Hct : hématocrite ; PLT : plaquettes ; NEUT : neutrophiles ; LYMPH : lymphocytes ; MONO : monocytes ; RET : réticulocytes ; NRBC : érythroblastes.

est systématiquement plus élevé avec le Sysmex XN-2000®. Cette différence est probablement due à la différence de méthodes utilisées par les deux types d'appareil.

Le module BF montre également une grande performance en termes de précision, de contamination et de linéarité pour les comptages des globules blancs (GB) et globules rouges (GR). Toutefois, ce module BF manque de sensibilité pour des valeurs inférieures à 1000 GR/ μ L et il est impossible d'avoir des valeurs intermédiaires de GR, l'appareil les dénombrant uniquement par tranche de 1000 GR/ μ L. Une limite de détection de 1 GR/ μ L avec une numération continue et non par tranche de 1000 GR/ μ L rendrait ce dispositif approprié pour les analyses de routine sur les liquides précieux tels les LCR.

Aspects qualitatifs

Avec le besoin de réduire les délais et coûts de réponse des résultats d'hématologie, il est nécessaire de réduire le nombre de revues microscopiques, sans pour autant réduire la qualité du diagnostic morphologique. Avec l'utilisation des analyseurs actuels d'hématologie, 80% des rejets sont déclenchés par des alarmes morphologiques générées par l'automate [12] dont 62% de faux positifs [13]. Les nouvelles générations d'appareils doivent donc augmenter la spécificité des alarmes, sans altérer le degré de sensibilité.

Notre étude démontre que, le Sysmex XN permet la réduction statistiquement significative du nombre de révisions microscopiques comparé à l'Advia (16,5% vs 20,2%, $p < 0,01$). Nos résultats ont montré une optimisation de la spécificité de l'alarme «Blasts» et de l'alarme «Ig» de l'appareil Sysmex. C'est principalement cette amélioration significative qui permet d'augmenter la spécificité globale de toutes les alarmes confondues par rapport à l'Advia (91,8% vs 82,1%, $p < 0,01$) (Tableau 5). En effet, les alarmes portant sur les lymphocytes ne sont pas significativement différentes entre les deux systèmes. L'introduction du canal WPC permettant de mieux différencier les blasts est probablement à l'origine de cette meilleure spécificité pour l'alarme blaste. La différence de spécificité au niveau de l'alarme «IG» peut être expliquée par le fait que l'Advia

ne donne que des indications qualitatives sur ce paramètre. Celle-ci est basée sur un calcul de différence de fractions leucocytaires des canaux MPO et Baso alors que l'appareil de Sysmex donne une numération quantitative des granulocytes immatures. En effet, la zone des granulocytes immatures dans le scattergramme WDF se situe au-dessus de celle des neutrophiles (Fig. 1), bien distincte des autres classes. Par ailleurs, notre étude montre une bonne concordance de ce comptage par rapport au comptage manuel (Tableau 4). Le Sysmex XN-2000® réalise également un comptage direct des NRBC par le canal WNR. Sur 25 échantillons contenant d'érythroblastes dans notre étude, ce comptage paraît concordant avec le comptage manuel (Tableau 4).

Par ailleurs, le Sysmex XN-2000® donne la fraction de plaquettes immatures (IPF) via le canal PLT-F qui pourrait être utile pour différencier les hypoplaquettes d'origine centrale ou périphérique.

Toutefois, nous avons constaté que le Sysmex XN-2000® nous donne moins d'informations sur les paramètres des globules rouges par rapport à l'Advia qui, grâce à la mesure de la concentration cellulaire en hémoglobine, réalise un scattergramme des globules rouges (diagramme de Mies). Ce scattergramme peut nous faire suspecter diverses hémoglobinopathies telles les thalassémies, la drépanocytose, ou une carence martiale [10,14]. La différence entre la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) avec la concentration d'hémoglobine interne des globules rouges (CHCM) fait suspecter une hémolyse ou une lipémie. Par ailleurs, du fait que la mesure des constantes érythrocytaires se fait par mesure optique après une sphérisation des GR, une valeur de MCHC supérieur à 36,5 doit faire suspecter une sphérocytose [10].

Aspects pratiques

La série XN peut être considérée comme une plate-forme dont l'importance est définie par l'utilisateur. En effet, le laboratoire peut l'utiliser comme un instrument unique ou sous forme d'un alignement allant jusqu'à neuf modules. Les paramètres analytiques peuvent être adaptés, ainsi, les canaux WPC, PLT-F et des réticulocytes peuvent être inclus ou exclus, permettant d'économiser les réactifs

Tableau 5 Étude comparative des alarmes morphologiques et du taux de revues manuelles.

	Sysmex XN-2000					Advia 2120i			
	Blasts	Abn Lymph	Atyp Lymph	Ig	Toutes les alarmes	Blasts	Atyp Lymph	Ig	Toutes les alarmes
Vrais positifs (VP)	9	8	6	20	43	9	15	20	44
Faux positifs (FP)	9	56	20	5	90	105	66	25	196
Vrais négatives (VN)	1120	1074	1112	1113	1005	1024	1057	1093	898
Spécificité VN/(VN + FP) (%)	99,20 ^a	95,04	98,23	99,55 ^b	91,78 ^a	90,70 ^a	94,12	97,76 ^b	82,08 ^a
Taux de revues manuelles (%)	16,5					20,2			

Ig : granulocytes immatures ; Atyp : lymphocytes atypiques ; Abn : lymphocytes anormaux.

^a $p < 0,01$.

^b $p < 0,05$.

Tableau 6 Précision intra- et inter-jour pour le comptage des GR et GB par le module comptage des liquides (BF).

		Précision intra-jour							Précision inter-jour	
		Dialysat	L. synovial 1	L. synovial 2	L. pleural 1	L. pleural 2	LCR	LCR	Niveau bas	Niveau élevé
GB	Comptage ($10^3/\mu\text{L}$)	$3,55 \times 10^3$	$1,59 \times 10^3$	$24,78 \times 10^3$	390	$2,7 \times 10^3$	20	50	70	330
	CV %	3,4	3,12	3,81	8,9	4,5	9,27	4,97	3,33	2,46
GR	Comptage ($10^3/\mu\text{L}$)	— ^a	— ^a	10	50	190	— ^a	— ^a	20	70
	CV %	— ^a	— ^a	5,38	6,07	1,2	— ^a	— ^a	2,15	2,78

GB : globules blancs ; GR : globules rouges ; LCR : liquide céphalorachidien ; L. : liquide.

^a Valeur inférieure à la limite de quantification ($< 6000 \text{ GR}/\mu\text{L}$).

lorsqu'ils ne sont pas indispensables. Le Sysmex XN 2000® est un automate compact. Cet automate utilise de très nombreux réactifs. Ceux-ci peuvent toutefois être facilement chargés en cours d'analyse et l'identification des contrôles et réactifs par code-a-barres facilite leur gestion. La maintenance est extrêmement simple. Quotidiennement, un rinçage du circuit fluidique est réalisé à la fin des analyses.

Les performances techniques du Sysmex XN 2000® en termes de cadence sont satisfaisantes en mode automatique (débit ~ 180 numérations-formules sanguines par heure en utilisant deux modules, temps de réalisation des réflexes compris). Par rapport à l'Advia, nous avons observé un gain de temps de trois à quatre minutes pour un rack de dix échantillons en mode automatique. Cependant, au moment où nous l'avons testé, l'appareil ne permettait pas le passage des tubes pédiatriques en mode automatique, ce point étant encore en cours de développement. Le passage en mode manuel ralentit fortement le débit des analyses.

Pour le module BF, l'appareil réalise automatiquement un (ou deux) cycles de lavage entre deux analyses afin de réduire le risque de contamination. En effet, même pour les liquides purulents, nous n'avons constaté aucune

contamination. Néanmoins, le temps d'un cycle de lavage est assez long (~ deux minutes pour un cycle) et le module ne peut faire d'autres analyses durant ce lavage. Le module informatique de l'automate peut être connecté au système informatique de gestion du laboratoire selon un mode bidirectionnel facilitant son intégration. Le Sysmex XN-2000® est intégrable dans une chaîne de robotisation préanalytique ainsi qu'un étaleur automatique et d'autres appareils.

Conclusion

Le Sysmex XN-2000 fournit des résultats fiables, reproductibles et stables pour une utilisation dans un laboratoire de routine. Il augmente l'efficacité du laboratoire en raison de sa rapidité, du taux réduit de révision manuelle et de l'augmentation de la spécificité des alarmes. Le mode BF permet une quantification automatique, rapide et précise de GR et GB ainsi que la différenciation entre les cellules polynucléées et mononucléées sur les liquides biologiques, même purulents. Une limite de détection de $1 \text{ GR}/\mu\text{L}$ avec une numération continue et non par tranche de $1000 \text{ GR}/\mu\text{L}$ rendrait ce dispositif approprié pour les analyses de routine sur les liquides précieux tels les LCR.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Sysmex corporation. Analyseur automatique d'hématologie série XN. Kobe, Japon, 2011.
- [2] Berge F, Maggiore G, Frenkian A. Point sur les avancées technologiques en hématocytométrie aux JIB 2011. IRBM News 2012;33:32–5.
- [3] Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Machin SJ. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter-the XE-2100. Clin Lab Haematol 2000;22:345–50.
- [4] Walters J, Garity P. Performance evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer. Lab Hematol 2000;6:83–92.
- [5] Briggs C, Hart D, Kunka S, Okuni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. Br J Haematol 2004;126:93–9.
- [6] Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Munos L, Perea G, Colomina I, et al. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. Eur J Haematol 2010;2: 158–63.
- [7] De Jonge R. Automated counting of white blood cells in synovial fluid. Sysmex J Int 2005;15:58–63.
- [8] De Jonge R, Brouwer R, de Graaf MT, Luitwieler RL, Fleming C, de Frankrijker-Merkestijn M, et al. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin Chem Lab Med 2010;48(5):665–75.
- [9] Williams JE, Walters J, Kabb K. Evaluation of the body fluid application on the Sysmex XE-5000 hematology analyzer. Lab Med 2011;42(7):395–401.
- [10] Siemens. Advia 2120 hematology system. Siemens healthcare diagnostics INC. Allemagne: Erlangen; 2008.
- [11] England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, Bull BS, Coulter WH, Fujimoto KA, et al. Guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those used for differential leucocyte and reticulocyte and cell marker applications. International council for standardization in haematology: prepared by the ICSH expert panel on cytometry. Clin Lab Haematol 1994;16:157–74.
- [12] Novis DA, Walsh M, Wilkinson D, St Louis M, Ben-Ezra J. Laboratory productivity and the rate of manual peripheral blood smear review: a college of American pathologists Q-Probes study of 95, 141 complete blood count determinations performed in 263 institutions. Arch Pathol Lab Med 2006;130: 596–601.
- [13] Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E, International consensus group for hematology. The international consensus group for hematology review suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Lab Hematol 2005;11:83–92.
- [14] Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassemia trait. Int J Lab Hem 2009;31: 528–34.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Carence en vitamine B12 chez un nourrisson de cinq mois : à propos d'un cas[☆]

Vitamin B12 deficiency in a five-month-old infant: A case report

M.-E. Cariou^{a,*}, A.-L. Joncquez^b, N. Prades^a, F. Schmitt^a

^a Laboratoire de biologie médicale, centre hospitalier de Bretagne Sud, BP 2233, 56322 Lorient cedex, France

^b Service de pédiatrie, centre hospitalier de Bretagne Sud, BP 2233, 56322 Lorient cedex, France

Reçu le 30 octobre 2012 ; accepté le 28 novembre 2012

KEYWORDS

Vitamine B12;
Psychomotor delay;
Failure to thrive;
Pernicious anaemia;
Breastfeeding

MOTS CLÉS

Vitamine B12 ;
Retard
psychomoteur ;
Stagnation
pondérale ;
Maladie de Biermer ;
Allaitement maternel

Summary We present a case of vitamin B12 deficiency in a five-month-old infant with failure to thrive and psychomotor delay. Blood cell count showed neutropenia and macrocytic anaemia with megaloblastic bone marrow. Vitamin B12 level was very low and associated with increased urinary methylmalonic acid, which confirmed vitamin B12 deficiency. Mother's unrecognized pernicious anaemia was reported in this infant exclusively breastfed. Vitamin B12 supply was effective on anaemia and psychomotor delay. This case figures out the importance of an early diagnosis in front of failure to thrive, given the risk of incomplete neurologic recovery due to vitamin B12 deficiency.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Nous rapportons le cas d'une carence en vitamine B12 chez un nourrisson découverte suite à une stagnation pondérale et un retard psychomoteur à l'âge de cinq mois. La numération sanguine mettait en évidence une neutropénie et une anémie macrocytaire avec mégalo-blastose médullaire. Le dosage de la vitamine B12 était effondré et associé à une acidurie méthylmalonique. Le bilan étiologique rapportait une maladie de Biermer maternelle méconnue chez cet enfant nourri exclusivement par allaitement maternel. Le traitement substitutif s'était révélé efficace tant sur les anomalies biologiques que sur le développement psychomoteur de l'enfant. Ce cas clinique illustre l'importance d'un diagnostic précoce devant tout retard pondéral en raison des conséquences neurologiques liées à la carence en vitamine B12, quelle qu'en soit l'étiologie.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La vitamine B12 intervient dans de nombreuses fonctions biologiques dont les principales sont l'hématopoïèse et le développement du système nerveux. À l'inverse des adultes, la carence chez l'enfant a des retentissements rapides et parfois irréversibles notamment sur le plan neurologique.

[☆] Ce travail a été divulgué auparavant sous forme de poster affiché au Colloque national des biologistes des hôpitaux à Angers du 26 au 30 septembre 2011.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : m.cariou@ch-bretagne-sud.fr (M.-E. Cariou).

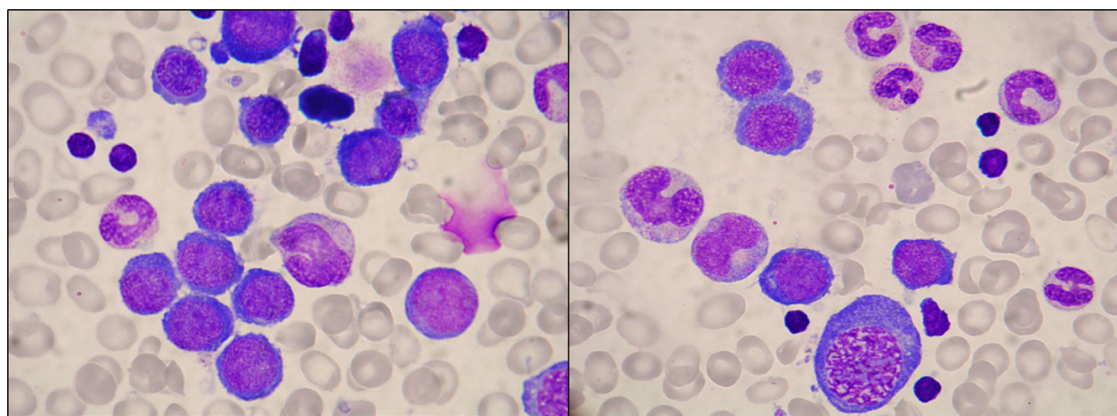


Figure 1 Myélogramme coloré au May-Grünwald Giemsa ($\times 500$) montrant des anomalies typiques de carence vitaminique.

Nous rapportons ici le cas d'un nourrisson de cinq mois présentant une carence en vitamine B12 découverte suite à une stagnation pondérale et un retard psychomoteur.

Observation

Un nourrisson de cinq mois consulte dans le service de pédiatrie pour une régression psychomotrice avec absence d'apparition de sourires-réponses, appauvrissement des interactions avec l'entourage, modification du tonus et troubles du sommeil. Il est né prématurément à 36 semaines d'aménorrhée. L'examen clinique et la numération sanguine étaient normaux à la naissance. Il a été vu en consultation à un mois et trois mois et demi avec à l'examen clinique une bonne poursuite oculaire, un bon tonus et une bonne croissance staturopondérale. En revanche, il n'a pas été observé de sourire-réponse à l'âge de trois mois et demi. Il est alimenté par allaitement maternel exclusif. L'examen clinique général rapporte une stagnation pondérale nette depuis deux mois. L'examen neurologique montre une poursuite oculaire fugace et limitée, une absence de sourire-réponse, une motricité saccadée et une hypotonie axiale. Le bilan biologique met en évidence une neutropénie persistante ($0,4 \text{ G/L}$, $n: 1-8 \text{ G/L}$) ainsi qu'une anémie macrocytaire arégénérative (hémoglobine: $9,8 \text{ g/dL}$, $n: 10-12 \text{ g/dL}$; VGM: $104,7 \text{ fL}$, $n: 73-100 \text{ fL}$). Les plaquettes sont normales. Le reste du bilan (ionogramme, urée, créatinine, calcium total, ferritine, TSH) est normal hormis une cytolysé hépatique avec des transaminases à quatre fois la normale. Le dosage des folates sériques est normal, celui de la vitamine B12 est effondré à 53 pg/mL ($n: 211-911 \text{ pg/mL}$).

Sa mère suit un régime alimentaire normal; elle a été supplémentée en fer et en folates pendant sa grossesse. Elle a pour antécédents une maladie de Basedow découverte il y a 15 ans et traitée plus récemment par thyroïdectomie totale, ainsi que des difficultés ovulatoires rapportées à la prise de Distilbène® chez sa mère. Il s'agissait ici d'une première grossesse menée à terme (une fausse couche antérieure).

Devant ce retard des acquisitions chez l'enfant associé à une stagnation pondérale et aux anomalies hématologiques, deux hypothèses principales sont évoquées: une carence en vitamine B12 ou une maladie progressive de type

métabolique. Des examens complémentaires à visée étiologique sont réalisés. Le myélogramme montre des anomalies évocatrices de carence vitaminique: asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique de la lignée érythroblastique avec mégalo-blastose, métamyélocytes géants au noyau rubané, excès de formes jeunes (Fig. 1). La chromatographie des acides aminés plasmatiques met en évidence une hypométhioninémie et celle des acides organiques urinaires une acidurie méthylmalonique très élevée ($4476 \mu\text{mol/mol}$ de créatinine, $n < 10 \mu\text{mol/mol}$). La recherche d'anticorps antifacteur intrinsèque et anti-cellules pariétales de l'estomac est négative. Le bilan effectué dans le cadre de la neutropénie ne retrouve pas d'anticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (Anca), d'anticorps antigranulocytaires ni d'infection virale (absence d'immunité contre *Herpes Virus 1-2* et *Parvovirus B19*, recherche de *Cytomégalo-virus* par PCR négative). Le dosage des immunoglobulines sériques montre une diminution des IgG à $1,4 \text{ g/L}$ ($n > 2 \text{ g/L}$), les IgA et IgM sont normales. Il n'y a pas d'anomalies des sous-populations lymphocytaires; les caryotypes sanguin et médullaire ne retrouvent pas d'anomalies.

L'électroencéphalogramme montre un ralentissement du tracé de veille et de sommeil. L'IRM cérébrale montre une atrophie cérébrale modérée avec un élargissement des espaces péricérébraux et un aspect discrètement élargi des ventricules latéraux ainsi qu'une collection péricérébrale bilatérale évoquant deux hématomes sous-duraux chroniques.

Dans ce contexte de carence un traitement parentéral par vitamine B12 est instauré (1 mg trois fois par semaine). L'évolution est rapidement favorable avec prise de poids, amélioration rapide des interactions (sourires-réponses), du tonus et des troubles du sommeil. Sur le plan biologique une réticulose survient au huitième jour et l'anémie se corrige en trois semaines (hémoglobine: $12,4 \text{ g/dL}$, $n: 10-12 \text{ g/dL}$; VGM: $80,3 \text{ fL}$, $n: 85-95 \text{ fL}$); la neutropénie se corrige en plusieurs mois. Les dosages de la vitamine B12 et de l'acidurie méthylmalonique sont normaux après quelques jours de traitement. Le traitement substitutif est rapidement passé par voie orale pour une durée totale de quatre mois. Au cours du traitement l'enfant a présenté des mouvements de tremblements fins des membres supérieurs. L'IRM cérébrale de contrôle montre une nette diminution des espaces liquidiens

péricérébraux et une disparition des hématomes sous-duraux. L'enfant a bénéficié d'une prise en charge dans un centre d'action médico-sociale précoce, avec des séances de kinésithérapie jusqu'à disparition du retard moteur. La marche est acquise à l'âge de 18 mois. À l'âge de deux ans il est suivi sur le plan psychomoteur et sur le plan orthophonique pour un retard de langage. Malgré les nombreux progrès constatés et en raison du manque suffisant de recul, le pronostic neurologique est encore difficile à évaluer.

Le bilan étiologique réalisé chez la mère ne retrouve pas d'anémie ni de macrocytose. La vitamine B12 est abaissée à 101 pg/mL (n : 200–1000 pg/mL) et l'homocystéine augmentée à 42,3 $\mu\text{mol/L}$ (n < 12 $\mu\text{mol/L}$) ce qui confirme la carence maternelle en vitamine B12. La recherche d'Anca et d'anticorps antifacteur intrinsèque est négative. La recherche d'anticorps anticellules pariétales de l'estomac revient fortement positive dans un contexte dysimmunitaire (présence d'anticorps antinucléaires à 1/200). L'examen d'une biopsie gastrique montre des lésions de gastrite interstitielle fundique atrophique. La recherche d'*Helicobacter pylori* est négative. Il n'y a aucun argument pour un syndrome de non-dissociation de la vitamine B12 (pas de prise d'antidiabétique oral ni d'inhibiteurs de la pompe à protons). Il s'agit donc incontestablement d'une maladie de Biermer chez cette femme expliquant la carence en vitamine B12 chez l'enfant exclusivement allaité. Elle sera suppléementée par de faibles doses de vitamine B12 en raison de l'absence de retentissement clinique et biologique.

Discussion

L'apport de vitamine B12 a lieu exclusivement à partir des aliments d'origine animale, sauf chez le nouveau-né dont le stock provient uniquement du transfert placentaire. La vitamine liée au facteur intrinsèque est absorbée dans l'intestin puis libérée dans la circulation grâce à un transporteur, la transcobalamine II. Elle agit comme coenzyme indispensable à deux réactions biochimiques dans l'organisme permettant ainsi de réduire la concentration de deux substances toxiques : l'homocystéine et le méthylmalonate (Fig. 2) [1].

Les principales conséquences de la carence en vitamine B12 chez le nouveau-né sont d'ordre hématologique (anémie macrocytaire arégénérative le plus souvent associée à une neutropénie) et neurologique (atrophie cérébrale et formation d'hématomes sous-duraux liés à l'élargissement des espaces péricérébraux comme dans notre observation). Devant toute anémie macrocytaire arégénérative chez l'enfant, il est nécessaire de rechercher une cytopathie mitochondriale, une anémie thiamine-sensible ou une carence en vitamine B12 ou en folates par malabsorption (maladie d'Ismerlünd), défaut de transport (déficit en transcobalamine II) ou défaut de métabolisme (entraînant une augmentation de l'homocystéine et une acidurie méthylmalonique comme rapporté dans notre cas) [2]. Les signes cliniques et biologiques ne permettent pas de distinguer les carences par malabsorption, défaut de synthèse ou déficit en transcobalamine II [2]. Devant une anémie macrocytaire, c'est la chromatographie des acides aminés plasmatiques qui oriente vers une étiologie selon la présence ou non d'une hypométhioninémie et d'une homocystinurie (Tableau 1). Dans notre observation c'est la neutropénie qui a en

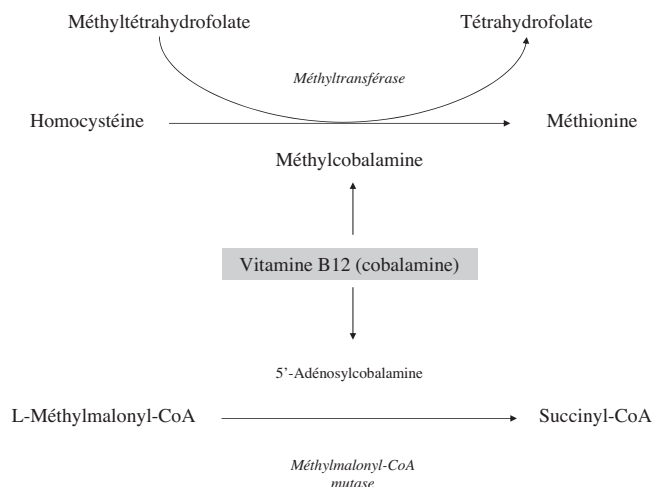


Figure 2 Rôle de coenzyme de la vitamine B12. D'après [1].

premier lieu alerté le médecin, plus que l'anémie qui était peu marquée. C'est pourquoi un bilan étiologique complet à la recherche d'une cause de neutropénie a été réalisé en parallèle du bilan de carence vitaminique.

Les signes cliniques le plus souvent à l'origine du diagnostic sont comme dans notre observation un retard pondéral, une régression psychomotrice, une hypotonie et des troubles du sommeil associés à une atrophie corticale prédominante dans la région frontotemporale [1,3]. Les lésions nerveuses dues à la carence en vitamine B12 seraient liées à une accumulation de méthylmalonyl-CoA qui interférerait avec la synthèse des lipides nécessaires à la constitution de la gaine de myéline. L'accumulation d'un métabolite neurotoxique liée à la perturbation du cycle de la méthionine pourrait également être responsable de ces lésions [4]. Actuellement les mécanismes des conséquences de la carence en vitamine B12 sur la myélinisation et le développement cérébral ne sont donc que partiellement élucidés [5]. Les atteintes neurologiques sont plus sévères chez le nourrisson avec une atrophie cérébrale prédominante, alors que chez l'adulte il s'agit principalement d'atteintes médullaires [6]. Malgré une bonne restauration sur le plan neurologique suite au traitement substitutif, le risque de séquelles à long terme est réel bien que difficile à évaluer [1].

Tableau 1 Maladies métaboliques s'accompagnant d'anémie mégalo-blastique.

Anémie mégalo-blastique

Avec homocystinurie et hypométhioninémie

Métabolisme des folates et de la vitamine B12

Sans homocystinurie ni hypométhioninémie

Oroticurie congénitale (hypochromie)

Syndrome de Pearson (sidéroblastes en couronne et vacuolisation des précurseurs)

Défaut de transport de la thiamine (sidéroblastes en couronne)

D'après [2].

L'augmentation des transaminases lors de carences en vitamine B12 n'est pas spécifique mais est retrouvée dans la plupart des cas [3]. Il en est de même avec la diminution des IgG sériques dont la pathogénie reste inconnue [6]. Des mouvements anormaux semblables à ceux observés dans notre cas sont décrits au bout de quelques jours de traitement ; leur origine est encore mal identifiée [6].

Les concentrations placentaires en vitamine B12 sont deux fois plus élevées dans la circulation sanguine fœtale en raison d'un transport actif, ce qui pourrait expliquer le développement normal du fœtus in utero [3]. La carence survient au bout de quelques mois d'allaitement exclusif. Une étude sur 40 enfants exclusivement nourris au lait maternel présentant une carence en vitamine B12 a montré un âge moyen au diagnostic à $4,4 \pm 2,5$ mois [3]. Dans notre observation comme dans la plupart des cas rapportés il n'existe pas d'anémie ou de macrocytose chez la mère mais une augmentation de l'homocystéine en lien avec le déficit en vitamine B12. Deux tiers des cas sont liés à un régime végétarien chez la mère, un quart des cas à une maladie de Biermer maternelle, les autres étant liés à des pathologies digestives ou des carences générales [3]. L'interrogatoire est donc capital pour préciser le mode d'alimentation maternelle, les antécédents familiaux et personnels à la recherche d'un contexte dysimmunitaire.

Conclusion

Les carences en vitamine B12 chez le nourrisson surviennent principalement chez les enfants exclusivement allaités nés de mère végétarienne, plus rarement chez des enfants nés de mère atteinte de maladie de Biermer méconnue. La plupart du temps la carence est asymptomatique chez la mère et sans manifestations hématologiques, comme dans notre observation. Le diagnostic précoce de la carence chez le nourrisson présentant un retard psychomoteur et pondéral

est capital puisqu'un retard à l'instauration du traitement peut entraîner des séquelles neurologiques irréversibles. Une supplémentation systématique pourrait être proposée à toutes les femmes enceintes ou allaitantes, voire aux nourrissons allaités de façon exclusive. L'intérêt et le coût d'une telle supplémentation ou d'un dépistage néonatal systématique restent toutefois à évaluer.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Mathey C, Di Marco JN, Poujol A, Cournelle MA, Brevaut V, Livet MO, et al. Stagnation pondérale et régression psychomotrice révélant une carence en vitamine B12 chez 3 nourrissons. *Arch Pediatr* 2007;14:467–71.
- [2] de Lonlay P, Fenneteau O, Touati G, Mignot C, Billette de Villemeur T, Rabier D, et al. Manifestations hématologiques dans les erreurs innées du métabolisme. *Arch Pediatr* 2002;8: 822–35.
- [3] Honzik T, Adamovicova M, Smolka A, Magner M, Hrubá E, Zeman J. Clinical presentation and metabolic consequences in 40 breastfed infants with nutritional vitamin B12 deficiency – what have we learned? *Eur J Paediatr Neurol* 2010;14:488–95.
- [4] Roschitz B, Plecko B, Huemer M, Biebl A, Foerster H, Sperl W. Nutritional infantile vitamin B12 deficiency: pathobiochemical considerations in seven patients. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90:F281–2.
- [5] Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl.): S126–31.
- [6] Avci Z, Turul T, Aysun S, Unal I. Involuntary movements and magnetic resonance imaging findings in infantile cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Pediatrics* 2003;112:684–6.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Cirrhose révélant une maladie cœliaque silencieuse : à propos d'un cas

Cirrhosis revealing silent celiac disease: A case report

A. Dekaken^a, A. Gouri^{b,*}, S. Rouabhia^c, A. Yakhlef^b, A.A. Bentorki^b

^a Service de médecine interne, hôpital El Okbi, 24000 Guelma, Algérie

^b Laboratoire de biochimie médicale, hôpital Ibn Zohr, 24000 Guelma, Algérie

^c Service de médecine interne, CHU Touhami Benflis, 05000 Batna, Algérie

Reçu le 20 novembre 2012 ; accepté le 27 novembre 2012

KEYWORDS

Celiac disease;
Cryptogenic cirrhosis

MOTS CLÉS

Maladie cœliaque ;
Cirrhose
cryptogénique

Summary Celiac disease is an autoimmune enteropathy which may be accompanied by various extraintestinal manifestations. We report in this paper an original observation of cryptogenic cirrhosis revealing celiac disease. A 25-year-old girl admitted for hepatosplenomegaly, physical examination discovered a portal hypertension syndrome and signs of liver failure. Further examination found that it was a cirrhosis of unknown etiology revealing celiac disease.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé La maladie cœliaque est une entéropathie auto-immune qui peut s'accompagner de diverses manifestations extra-intestinales. Nous rapportons dans cet article une observation originale d'une cirrhose cryptogénique révélant une maladie cœliaque. Il s'agit d'une fille âgée de 25 ans, admise pour hépatosplénomégalie, l'examen physique découvre un syndrome d'hypertension portale et des signes d'insuffisance hépatocellulaire. Le bilan complémentaire trouve qu'il s'agit d'une cirrhose d'étiologie indéterminée révélant une maladie cœliaque.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La maladie cœliaque (MC) est une entéropathie auto-immune provoquée par un antigène alimentaire, la gliadine du gluten. Le diagnostic de la maladie est basé sur des arguments cliniques, sérologiques et histologiques. Sur le plan clinique, le tableau est très variable. Les

signes les plus fréquents sont des douleurs abdominales, une diarrhée chronique et un amaigrissement. Cependant, l'existence des formes asymptomatiques surtout chez l'adulte est probablement à l'origine d'une sous-estimation de la fréquence de cette maladie, qui peut avoir une révélation atypique. La MC peut s'accompagner aussi de multiples manifestations extra-intestinales. L'atteinte hépatique est fréquente, mais souvent méconnue.

Nous rapportons dans cet article le cas d'une cirrhose hépatique révélant une MC silencieuse. C'est une association très peu décrite dans la littérature.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : pharmagor@gmail.com (A. Gouri).

Observation

Mlle H.Z. âgée de 25 ans, célibataire, est admise au service de médecine interne pour une splénomégalie évoluant depuis trois mois. Dans ses antécédents personnels, on retrouvait la notion d'un retard pubertaire : aménorrhée primaire et absence des caractères sexuels secondaires. En plus, notre patiente était atteinte d'une fente vélo-palatine opérée à l'âge de six ans. Ses antécédents familiaux étaient sans particularité.

À l'examen physique, l'état général était peu altéré avec un indice de masse corporelle (IMC) de l'ordre de 16,89 kg/m². La malade était apyrétique avec une bonne coloration cutanéomuqueuse.

L'examen digestif montrait une circulation veineuse collatérale abdominale avec une splénomégalie au stade 2. En revanche, l'auscultation cardiopulmonaire était normale.

L'examen biologique montrait une perturbation des paramètres suivants : aspartate aminotransférase (ASAT) à 142 UI/L (N < 40 UI/L), alanine aminotransférase (ALAT) à 124 UI/L (N < 40 UI/L), lactate déshydrogénase (LDH) à 966 UI/L (N < 460 UI/L), vitesse de sédimentation (VS) à 90 mm (N < 20 mm), taux de prothrombine (TP) à 65 % (N : 75–100 %). Alors que le reste des paramètres comportait la bilirubine, gamma glutamyl transpeptidase (GT), phosphatases alcalines, bilan lipidique, rénal, protidique, phosphocalcique et glycémie étaient tous normaux (Tableau 1).

À l'hémogramme, l'hémoglobine était à 94 g/L (N : 115–160), le volume globulaire moyen (VGM) à 74 fl (N : 84–96) et la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH) à 38 % (N : 31–36), globules blancs à $1,7 \times 10^3$ /L (N : $4\text{--}10 \times 10^3$) et plaquettes à 61×10^3 /L (N : $150\text{--}400 \times 10^3$). Le bilan martial et la ferritinémie étaient normaux.

La ponction de moelle identifiait une dysérythropoïèse mais en absence de cellules de surcharge ou de corps de Leishmanies.

La sérologie virale pour l'hépatite B et C était négative. Le bilan immunologique comportant la recherche des anticorps antinucléaires, *anti-liver kidney microsomes* (anti-LKM), anti-muscle lisse et anti-mitochondries était négatif. Cependant, la recherche des anticorps anti-endomysium et anti-gliadine était positive.

L'examen radiologique du thorax et l'électrocardiogramme (ECG) étaient normaux. L'écho-Doppler abdominale révélait un foie augmenté de volume (flèche hépatique de 168 mm) régulier et échogène, tronc porte et veine splénique dilatées sans thrombose, en plus d'une splénomégalie qui était au début le motif de consultation.

La fibroscopie digestive haute permettait de mettre en évidence une gastrite érythémateuse en mosaïque et des varices tubérositaires grade I. La biopsie duodénale objectivait une atrophie villositaire totale. La ponction biopsie hépatique transpariétale n'a pu être réalisée en raison de la thrombopénie sévère dont souffrait notre patiente.

L'examen ophtalmique ne montrait pas d'anneau péri-cornéen. L'examen des mains découvrait un hippocratisme digital avec des anneaux blancs.

Tableau 1 Bilan biologique à l'admission.
Biological data on admission.

Paramètre	Résultat
Leucocytes	$1,7 \times 10^3$ /L (N : $4\text{--}10 \times 10^3$ /L)
Hématies	$3,3 \times 10^{12}$ /mm ³ (N : $4,5\text{--}5,1 \times 10^{12}$ /L)
Hémoglobine	94 g/L (N : 115–160)
Hématocrite	0,247 (N : 0,370–0,470)
VGM	74 fl (N : 84–96)
CCMH	38 % (N : 31–36)
Plaquettes	61×10^3 /L (N : $150\text{--}400 \times 10^3$)
Vitesse de sédimentation	90 mm (N < 20 mm)
Taux de prothrombine	65 % (N : 75–100 %)
Albuminémie	34,3 (N : 35–50 g/L)
Protidémie	59 (N : 60–80 g/L)
Glycémie	5,3 mmol/L (N : 3,33–6,10 mmol/L)
Cholestérolémie	2,6 mmol/L (N : 3,47–6,45 mmol/L)
Triglycéridémie	0,96 mmol/L (N : 0,47–1,89 mmol/L)
Bilirubinémie total	9 µmol/L (N : 1–12 µmol/L)
ASAT	142 UI/L (N : 5–45 UI/L)
ALAT	124 UI/L (N : 5–45 UI/L)
Phosphatases alcalines	120 UI/L (N : 98–279 UI/L)
GammaGT	22 UI/L (N : 11–50 UI/L)
LDH	966 UI/L (N : 230–460 UI/L)
Calcémie	2,16 mmol/L (N : 2,1–2,6 mmol/L)
Phosphorémie	1,12 mmol/L (N : 0,80–1,61 mmol/L)
Créatinine	68 µmol/L (N : 53–97 µmol/L)
Urée	5,20 mmol/L (N : 2,49–7,49 mmol/L)
Fer sérique	17,25 µmol/L (N : 7,16–26,85 µmol/L)
Ferritinémie	6 µg/L (N : 15–150 µg/L)
Antigène HbS	Négatif
Anticorps anti HVC	Négatifs
Anticorps anti-gliadine	Positifs
Anticorps anti-endomysium	Positifs
Anticorps anti-nucléaires	Négatifs
Anticorps anti-muscle lisse	Négatifs
Anticorps anti-Mitochondries	Négatifs
Anticorps anti-KLM1	Négatifs

VGM : volume globulaire moyen ; CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; ASAT : aspartate aminotransférase ; ALAT : alanine aminotransférase ; GammaGT : gamma glutamyl transpeptidase ; LDH : lactate déshydrogénase.

À la base des ces données cliniques et paracliniques, le diagnostic retenu était d'une cirrhose cryptogénique associée à une MC.

Un traitement par les inhibiteurs de la pompe à proton et un régime sans gluten étaient alors mis en place. Une endoscopie de contrôle réalisée un mois plus tard objectivait la persistance d'une atrophie villositaire malgré la normalisation des anticorps spécifiques et un régime bien suivi.

Discussion

La MC est une entéropathie auto-immune liée à une intolérance au gluten. Le mécanisme de l'atteinte immunologique est maintenant bien connu et représente un modèle en pathologie générale [1]. La forme classique caractérisée par l'association de diarrhée, d'amaigrissement, de douleurs abdominales avec flatulence, de malabsorption (stéatorrhée) est trop connue pour insister (20 % des cas). Les formes latentes (silencieuses) sont essentiellement des formes frustes ou atypiques qui posent un problème de diagnostic [2].

Au moins 20 à 30 % des patients atteints de la MC présentent des manifestations extra-intestinales [3] ; les lésions hépatiques, décrites pour la première fois en 1977, sont les plus communes [4]. Il existe deux types principaux de lésion hépatique dans la MC : cryptogénique et auto-immune, les lésions cryptogéniques sont les plus fréquentes et elles sont généralement asymptomatiques. La physiopathologie de l'atteinte hépatique dans la MC est mal connue et probablement non univoque [5].

Le diagnostic de cirrhose, dans notre cas, était suggéré devant les signes cliniques et biologiques suivants : la circulation veineuse collatérale abdominale, l'hépatomégalie, la splénomégalie, la dilatation du tronc porte, les varices tubérositaires grade I et les anomalies des tests hépatiques. Le diagnostic étiologique restait négatif malgré un bilan exhaustif (sérologies virales, bilan immunologique, pas de signes indirects de surcharge hépatique).

La MC était retenue devant l'atrophie villositaire totale et la positivité des anticorps anti-endomysium et anti-gliadine. Cette MC pourrait expliquer la cirrhose. Récemment, des cas d'associations de MC et hypertension portale non cirrhotique ont été rapportés [6–9]. Cependant, à notre connaissance, l'association MC cirrhose cryptogénique n'a jamais été décrite dans la littérature.

En effet, l'atteinte hépatique est fréquente au cours de la MC. Et elle est essentiellement représentée par des anomalies non spécifiques des tests biologiques hépatiques (15 à 61 %). Ces atteintes ont la particularité d'être généralement résolutive après instauration d'un régime sans gluten.

Dans de rares cas, elle est associée à des atteintes hépatiques plus spécifiques comme la cirrhose biliaire primitive (3 à 7 %), cholangite sclérosante primitive (2 à 3 %), hépatite auto-immune souvent type 1 (3 à 6 %), stéatose hépatique (si malabsorption sévère), hépatite virale C (1,2 %), hépatite granulomateuse, hémochromatose primitive et thromboses des vaisseaux hépatiques [5,10]. Lors de ces maladies, contrairement aux formes précédentes, il n'y a généralement pas d'amélioration de la fonction hépatique sous régime sans gluten [11].

Exceptionnellement l'atteinte hépatique au stade de cirrhose est révélatrice de la MC comme dans notre cas.

Le mécanisme physiopathologique est inconnu (rôle de la malabsorption et malnutrition chronique, pullulation microbienne intestinale, augmentation de la perméabilité intestinale, inflammation chronique intestinale).

Conclusion

Le dépistage de la MC à l'aide d'un dosage sérique des anticorps anti-endomysium et/ou anti-gliadine est maintenant non seulement recommandé devant toute perturbation du bilan hépatique restant inexplicée mais également devant une cirrhose cryptogénique. Il serait intéressant de réaliser des études épidémiologiques pour comprendre la nature du lien qui relie ces deux entités.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 2009;137(6):1912–33.
- [2] Rousset H. Les formes inaugurales inhabituelles de la maladie cœliaque chez l'adulte. *Rev Med Interne* 2002;23(Suppl. 1):27–31.
- [3] Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:234–42.
- [4] Mounajjed T, Oxentenko A, Shmidt E, Smyrk T. The liver in celiac disease. *Am J Clin Pathol* 2011;136:128–37.
- [5] Volta U. Pathogenesis and clinical significance of liver injury in celiac disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009;36:62–70.
- [6] M'saddek F, Gaha K, Ben Hammouda R, Ben Abdelhafidh N, Bougrine F, Battikh R, et al. Idiopathic portal hypertension associated with celiac disease: one case. *Gastroenterol Clin Biol* 2007;31:869–71.
- [7] Kara B, Sandikci M. Successful treatment of portal hypertension and hypoparathyroidism with a gluten-free diet. *J Clin Gastroenterol* 2007;41:724–5.
- [8] Sharma BC, Bhasin DK, Nada R. Association of celiac disease with non-cirrhotic portal fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:332–4.
- [9] Zamani F, Amiri A, Shakeri R, Zare A, Mohamadnejad M. Celiac disease as a potential cause of idiopathic portal hypertension: a case report. *J Med Case Rep* 2009;3:68.
- [10] Rubio-Tapia A, Murray JA. The liver in celiac disease. *Hepatology* 2007;46:1650–8.
- [11] Kaukinen K, Halme L, Collin P, Färkkilä M, Mäki M, Vehmanen P, et al. Celiac disease in patients with severe liver disease: gluten-free diet may reverse hepatic failure. *Gastroenterology* 2002;122:881–8.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Découverte d'une sphérocytose héréditaire à 82 ans : mieux vaut tard que jamais ![☆]

Discovery of spherocytosis at 82 years old: Better late than never!

A.-C. Hochart-Behra^{a,*}, A. Paris^a, I.-M. Descamps^a, B. Gressier^{a,b}

^a Laboratoire de biologie médicale polyvalente et de pharmaco-toxicologie, centre hospitalier d'Armentières, 112, rue Sadi-Carnot, BP 189, 59421 Armentières cedex, France

^b Laboratoire de pharmacologie et pharmacocinétique, faculté de pharmacie, université de Lille 2, 3, rue du Professeur-Laguesse, BP 83, 59006 Lille cedex, France

Reçu le 30 novembre 2012 ; accepté le 19 décembre 2012

KEYWORDS

Haemolytic anemia;
Corpuscular
hemolytic anemia;
Constitutional
hemolytic anemia;
Blood smear;
Spherocytosis;
Band 3 protein
deficiency;
Pincered erythrocyte

Summary Anemia is the most common abnormality of the blood count. A rigorous and hierarchical approach allows understanding of its etiology. The blood smear examination remains a milestone of reasoning. Detection of spherocytes is common in anemia with mechanical or immunological causes. However, some morphological characteristics of red blood cells can orient the diagnosis towards congenital hemolytic anemia. Thus, in the case of our observation, visualization of pincered erythrocytes let us suspect a spherocytosis caused by a defect of band 3 protein in the erythrocyte membrane. This was confirmed by an increase in erythrocyte osmotic fragility. Specialized but less accessible methods bring a definitive diagnosis. The late diagnosis of this anomaly is explained by the moderate intensity of hemolysis. Complex entanglement of various etiologies of anemia for seniors is another source of diagnostic difficulty. For our patient, a hemorrhagic part linked to an anti-vitamin K overdose and an inflammatory part cannot indeed be excluded in the anemia explanation.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Anémie hémolytique ;
Anémie hémolytique
corpusculaire ;
Anémie hémolytique
constitutionnelle ;
Frottis sanguin ;

Résumé L'anémie est la plus fréquente des anomalies de l'hémogramme. Une démarche rigoureuse et hiérarchisée permet d'appréhender son étiologie. L'examen du frottis sanguin demeure une étape capitale de ce raisonnement. La détection de microsphérocytes est fréquente dans les anémies de causes mécanique ou immunologique. Néanmoins, certaines particularités morphologiques des hématies peuvent orienter le diagnostic vers les anémies hémolytiques congénitales. Ainsi, dans le cas de notre observation, la visualisation d'hématies pincées a permis de suspecter une sphérocytose causée par un déficit en protéine bande 3 de la membrane érythrocytaire. Cela a été confirmé par une augmentation de la fragilité osmotique érythrocytaire. Des méthodes spécialisées mais plus difficiles d'accès apportent un diagnostic

[☆] Publication sur proposition (suite au colloque annuel de la CORATA ayant eu lieu à Lille du 13 au 15 juin 2012).

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : ac.hochart@ch-armentieres.fr (A.-C. Hochart-Behra).

Sphérocytose ;
Déficit en protéine
bande 3 ;
Hématie pincée

de certitude. Le diagnostic souvent tardif de cette anomalie s'explique par l'intensité modérée de l'hémolyse. L'intrication complexe des différentes étiologies d'anémie pour les plus âgés est une autre source de difficulté diagnostique. Pour notre patient, une part hémorragique liée à un surdosage en anti-vitamines K et une part inflammatoire ne peuvent en effet être exclues.
© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Dès lors qu'une anémie est constatée, la détermination de son étiologie est cruciale. Si de nombreuses causes sont faciles à identifier, dans un certain nombre de situations où les mécanismes sont intriqués, comme c'est souvent le cas chez les personnes âgées de plus de 75 ans, aucun diagnostic précis ne peut être posé. L'examen du frottis sanguin par le biologiste peut amener des éléments importants dans la démarche diagnostique, d'autant plus s'il est orienté par un dialogue clinico-biologique. Nous rapportons ici l'observation d'un patient chez qui une anémie hémolytique, en rapport avec une anomalie de la membrane du globule rouge – le déficit en protéine « bande 3 » – a ainsi été découverte. La lecture attentive du frottis a permis d'orienter le diagnostic vers une sphérocytose héréditaire.

Observation

Monsieur T., 82 ans, est hospitalisé pour décompensation cardiorespiratoire due à une surinfection de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). Ses antécédents personnels comptent asthme, BPCO, insuffisance surrénalienne chronique, cardiopathie ischémique, prothèses de hanches bilatérales, abcès cérébraux, hernie inguinale et hiatale. Il est traité depuis cinq mois par un anti-vitamine K (AVK) (fluindione). L'hémogramme révèle une anémie modérée (Hb : 11,4 g/dL), normocytaire (VGM : 88 fL), normochrome (CCMH à 32,6 %), à la limite de la régénération (réticulocytes : 114 G/L, valeurs de références [VR] pour un homme de plus de 50 ans : 32–104 G/L, VR de la limite de régénération : plus de 120 G/L [1]). Dans le cadre de cette observation, il est recherché la/les étiologies de cette anémie selon la démarche présentée sur la Fig. 1. L'anémie est sans doute ici multifactorielle. Si la présence d'un syndrome myélodysplasique, suspecté devant la thrombopénie (123 G/L, VR : 150–450) et l'hypogranulation des polynucléaires neutrophiles, est finalement écartée (absence d'anomalies sur le myélogramme), l'anémie peut être liée :

- au syndrome inflammatoire biologique mis en évidence dans un contexte infectieux ($\alpha 1$ et $\alpha 2$ globulines = 10,1 et 13,5 %, VR : 2,9–4,9 et 7,1–11,8 ; CRP = 248 mg/L, VR : 0–2) ;
- à une hémorragie causée par un surdosage modéré en AVK (INR = 4,5 et 5 au moment de l'hospitalisation) malgré l'absence de saignement extériorisé ;
- à une hémolyse. En effet, vu le caractère faiblement régénératif de l'anémie, les LDH sériques élevées (247 UI/L, VR : 100–190), la valeur normale d'haptoglobine malgré la présence d'un syndrome inflammatoire (2,09 g/L, VR : 0,3–2), les causes d'hémolyse sont recherchées :

- le test de Coombs négatif élimine une cause immuno-logique,
- l'absence de schizocytes au frottis écarte une hémolyse mécanique,
- sont observés au frottis de rares microsphérocytes et des globules rouges qui présentent un « bourgeonnement » avec étranglement à un pôle de la cellule en forme de champignon (Fig. 2).

La découverte fortuite à l'examen du frottis sanguin de telles anomalies morphologiques des globules rouges évoque une forme particulière de maladie de la membrane érythrocytaire : la sphérocytose héréditaire par déficit en protéine bande 3. Ce diagnostic est étayé par un test de résistance osmotique aux solutions hypotoniques mettant en évidence une petite augmentation de la fragilité globulaire osmotique (début d'hémolyse : 6,0 g/L NaCl, VR 4,0–5,0). Pour confirmer le diagnostic, des techniques spécialisées existent : ektacytométrie et électrophorèse des protéines du cytosquelette de membrane érythrocytaire. Il est décidé de ne pas pousser plus avant les investigations, le seul traitement étant la splénectomie, inutile dans ce cas où l'anémie est bien tolérée sur le plan clinique. Toutefois, une enquête familiale est proposée aux enfants et petits-enfants à la recherche de ce déficit.

Discussion

L'anémie du sujet âgé de plus de 75 ans est fréquente et sa correction est souvent synonyme d'une amélioration substantielle de qualité de vie. Les mécanismes physiopathologiques sont les mêmes que chez les patients plus jeunes mais leur identification est souvent plus complexe, car l'anémie est souvent multifactorielle [2]. Il convient alors de réaliser un bilan étiologique exhaustif en envisageant d'emblée toutes les causes possibles selon un arbre décisionnel méthodique (Fig. 1). Pour Monsieur T., une des causes de son anémie s'avère être liée à une hémolyse intravasculaire. Les anémies hémolytiques ont une origine extracorporelle ou corporelle. Dans ce dernier cas, les anomalies des hématies sont soit acquises (hémoglobinurie paroxystique nocturne, hémolyse mécanique liée à la présence de valves cardiaques prothétiques, à une microangiopathie thrombotique ou à des brûlures étendues par exemple), soit constitutionnelles. Les atteintes des hématies peuvent alors toucher les enzymes, l'hémoglobine ou la membrane. Dans ce contexte et pour un certain nombre de cas, le simple examen de la morphologie érythrocytaire au frottis peut orienter le diagnostic [3]. Par exemple, hématies cibles et/ou falciformes sont observées lors de l'atteinte d'enzymes érythrocytaires. Une altération de la forme des globules rouges est aussi décelable au

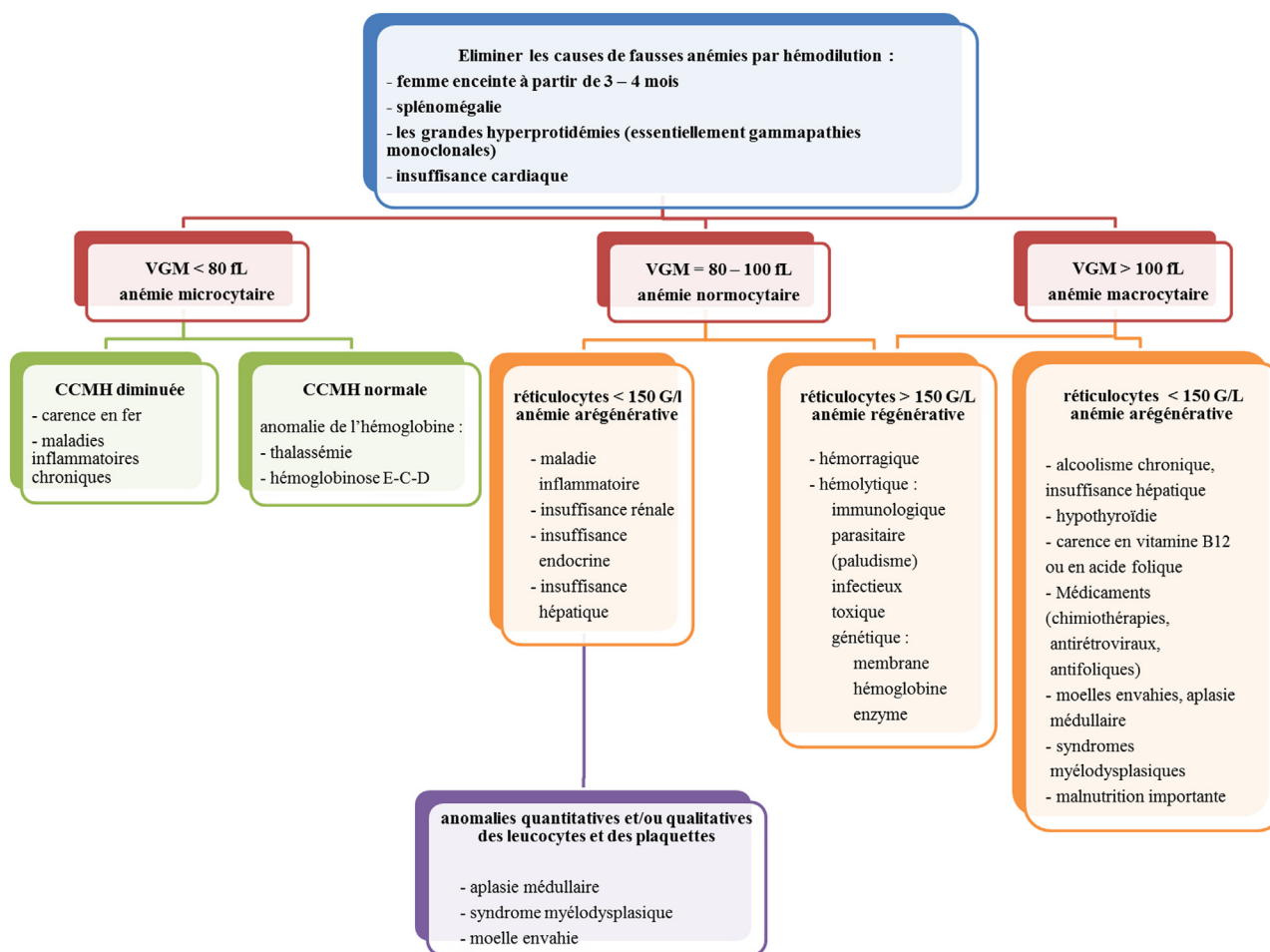


Figure 1 Démarche diagnostique hiérarchisée pour la recherche de l'étiologie d'une anémie. VGM : volume globulaire moyen ; CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

frottis lors des atteintes protéiques de la membrane érythrocytaire : elliptocytoses, stomatocytoses, sphérocytoses héréditaires... Bien que les principales mutations génétiques responsables de sphérocytoses héréditaires soient hétérogènes, la conséquence commune est une déstabilisation de la bicouche phospholipidique due à l'altération

du lien entre le cytosquelette et les protéines de structure membranaires. Des vésicules sans cytosquelette sont alors libérées et des sphérocytes, de circonférence réduite et peu déformables, apparaissent (Fig. 2). Ils ont un diamètre réduit et une épaisseur accrue par rapport aux autres hématies et ne possèdent pas de zone claire centrale [3]. Ils sont

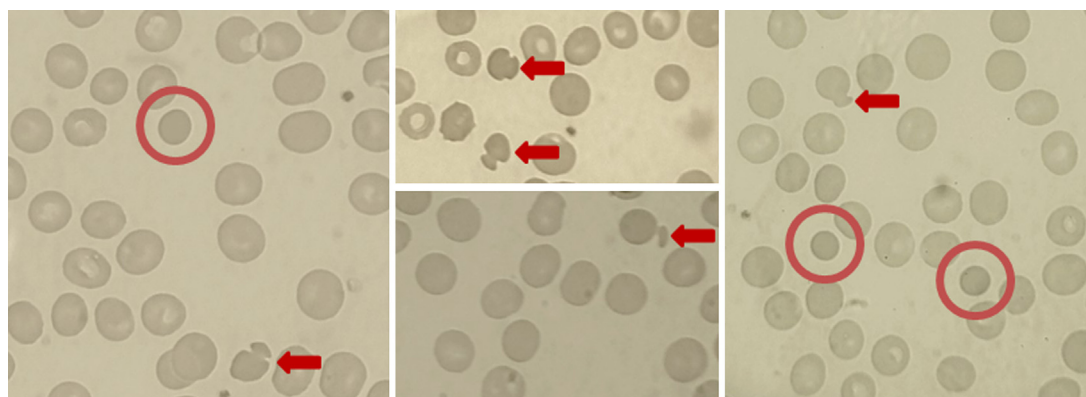


Figure 2 Images du frottis sanguin de Monsieur T. (coloration de May-Grünwald-Giemsa). Des sphérocytes (cerclés) et des hématies pincées/en forme de « champignons » (fléchées) sont visualisés et orientent le diagnostic vers un déficit en protéine bande 3 de la membrane érythrocytaire.

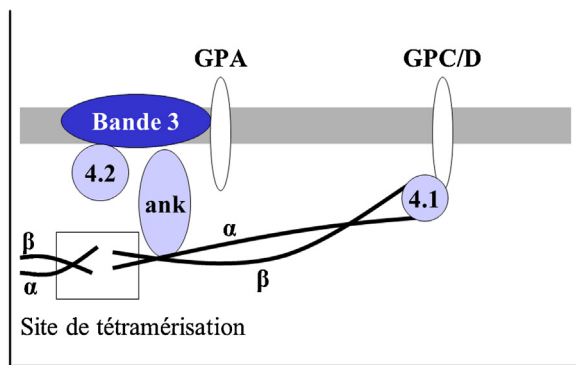


Figure 3 Schéma simplifié de la membrane érythrocytaire. Ank: ankyrine; GPA: glycopherine A; GPC/D: glycopherine C/D; Bande 3: protéine bande 3; 4.1: protéine 4.1; 4.2: protéine 4.2; α : chaîne α de spectrine; β : chaîne β de spectrine. D'après Perotta et al., [4].

détruits par la rate, ce qui est principalement responsable de l'hémolyse chronique [4]. Des défauts de l'ankyrine et/ou de la spectrine, de la protéine bande 3, de la protéine 4.2 et du complexe Rhésus sont responsables de ces phénomènes (Fig. 3). Dans un tiers des cas de sphérocytoses héréditaires, comme dans le cas de notre observation, c'est la protéine bande 3, codée par le gène *SLC4A1*, qui est déficiente [4] et des hématies « pincées » (en forme de « champignon ») sont décelables.

La sévérité des symptômes occasionnés par une sphérocytose est variable. Elle influencera l'attitude thérapeutique. Pour ce qui est du type de sphérocytose établi chez Monsieur T., l'atteinte est le plus souvent modérée [4], avec une compensation de l'hémolyse et une hémoglobine à plus de 80 g/L. Cela explique le diagnostic très tardif de l'anomalie pour notre patient. Des circonstances particulières peuvent aggraver toutefois l'hémolyse (grossesse, splénomégalie liée à une infection par l'Epstein-Barr virus par exemple...) et sont parfois révélatrices de la maladie. Si la splénectomie est recommandée dans les formes sévères ou modérément sévères de sphérocytose, ses indications sont plus discutées pour des formes peu symptomatiques. En effet, les complications d'une splénectomie sont à prendre en compte à court terme (infections, hémorragies, pancréatite) et à long terme avec d'éventuels événements thrombotiques, conséquences d'un taux d'hémoglobine s'élevant au-delà de la norme [4].

Quant au diagnostic biologique de sphérocytose, comme nous l'avons présenté ci-dessus, il repose en premier lieu

sur des examens accessibles et simples de mise en œuvre, comprenant en particulier le décompte des réticulocytes, l'examen de la morphologie érythrocytaire au frottis sanguin et la mesure de fragilité des hématies aux solutions hypotoniques. Cette dernière peut rester normale [5] et ne doit pas dissuader de poursuivre les investigations avec des tests plus spécialisés comme l'ektacytométrie et l'électrophorèse des protéines du cytosquelette de membrane érythrocytaire qui apportent le diagnostic de certitude. Des tests de mesure de fluorescence par cytométrie de flux après marquage par l'EMA (éosine 5'-maléimide) sont aussi contributifs. L'EMA se fixe sur la protéine bande 3 des hématies et la fluorescence est donc constamment diminuée en cas de sphérocytose héréditaire [5]. Il est à noter que les microsphérocytes ne sont pas pathognomoniques de la sphérocytose héréditaire. Ainsi, dans le cadre d'anémies hémolytiques auto-immunes avec test de Coombs positif, une sphérisation de l'ensemble des hématies peut être observée. Dans les anémies hémolytiques mécaniques, une partie des schizocytes peut se sphériser, formant des microsphérocytes. Mais les sphérocytes peuvent aussi être retrouvés dans la pyropoikilocytose héréditaire, en cas d'absence d'antigène Rh, d'hémolyses toxiques ou infectieuses et de déficit en pyruvate kinase (plus rarement en glucose-6-phosphate déshydrogénase) [3].

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Anaes. Lecture critique de l'hémogramme: valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques. Références médicales 1997.
- [2] Levy C, Siguret V. L'anémie du sujet âgé: une étiologie peut en cacher une autre! *Immuno-Anal Biol Spec* 2007;22: 215–21.
- [3] Fenneteau O, Maier-Redelsperger M. Apport de l'examen du frottis de sang pour le diagnostic de la pathologie constitutionnelle du globule rouge. *Rev Fr Lab* 2000;324: 51–62.
- [4] Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet* 2008;372:1411–26.
- [5] Martinaud C, Gaillard T, Gisserot O, de Jauréguiberry JP, Graffin B, Brisou P, et al. L'intérêt de l'examen attentif du frottis sanguin dans le diagnostic des anémies hémolytiques. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007;65:271–6.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques du dosage sanguin du tacrolimus

Immunoanalytical characteristics of blood tacrolimus assay

P. Corteel

22, rue du Champ-Lagarde, 78000 Versailles, France

Reçu le 23 octobre 2012 ; accepté le 24 octobre 2012

KEYWORDS

Tacrolimus;
Tacrolimus
immunoassay;
Preanalytical
conditions

MOTS CLÉS

Tacrolimus ;
Immunodosage du
tacrolimus ;
Pré-analytique

Summary After a presentation of the tacrolimus structure, this paper points out the interfering molecules. Then, optimal preanalytical conditions are defined and immunoassay technics reviewed.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé L'article présente la structure du tacrolimus en signalant les molécules susceptibles d'interférences dans les dosages. Les conditions pré-analytiques optimales sont précisées ainsi que les différentes techniques d'immunodosage.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Le tacrolimus [1] est un macrolide de la famille des lactones isolé d'une bactérie *Streptomyces tsukubaensis*, doué de propriétés immunosuppressives ; on retrouve dans tacrolimus le T de son origine, le CRO de sa classe antibiotique et enfin ses propriétés immunosuppressives dans sa terminaison.

Son nom chimique est le oxazacyclotricosine-1, 7, 20,21(4heures, 23 heures)-tetrone, monohydrate, connu sous les synonymes FK- 506, Fujimycine. Sa formule brute : C₄₄H₆₉N₁₂O₁₂.

La Fig. 1 donne sa formule développée.

Sa masse moléculaire est de 822 daltons.

C'est une molécule qui absorbe peu dans l'ultraviolet et qui n'est pas fluorescente.

Elle est très faiblement soluble dans l'eau, soluble dans les lipides, le méthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éther et l'acétone.

Sa demi-vie est variable : elle est de 11,3 heures.

Elle est douée de propriétés immunosuppressives qui la fait utiliser en transplantations d'organes pour la prévention du rejet des allogreffes (foie, rein, cœur, intestin grêle, pancréas, poumon, trachée, peau, cornée, moelle osseuse et membre) et en dermatologie.

Tout comme pour la ciclosporine, l'activité immunosuppressive [2] du tacrolimus est due à l'inhibition de la calcineurine, protéine du cytosol des lymphocytes T ; la calcineurine ne peut pas déphosphoryler le *nuclear factor of*

Adresse e-mail : philippe.corteel@numericable.fr

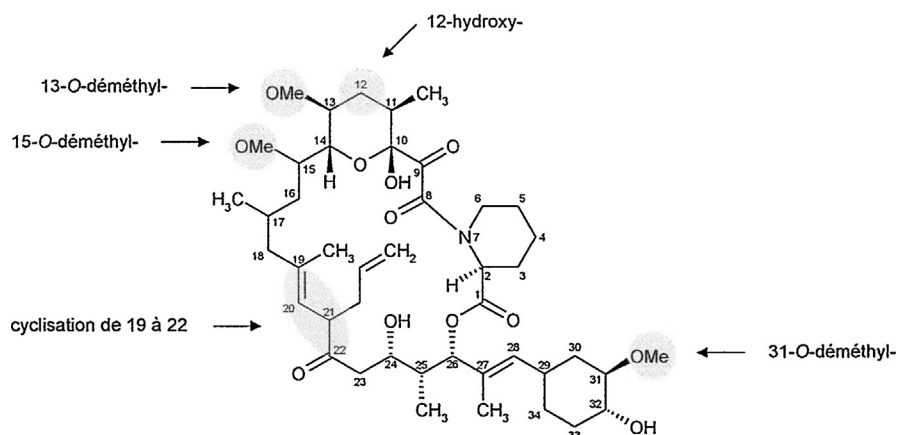


Figure 1 Formule développée du oxaazacyclotricosine-1, 7, 20, 21 (quatre heures, 23 heures)-tetrone, monohydrate (tacrolimus, FK-506, Fujimycine).

activated T cells (NFAT) ; la conséquence est l'inhibition de la synthèse de l'Interleukine 2 (IL-2) et par conséquent de la prolifération des lymphocytes T. Mais le tacrolimus est 100 fois plus puissant que la Ciclosporine.

Son utilisation a considérablement amélioré le succès des transplantations. Toutefois, la zone thérapeutique est voisine de la zone toxique ; cette molécule ralentit la filtration glomérulaire et induit une hypertension, est à l'origine de diabète et de neuropathies ; on a une marge de manœuvre limitée pour avoir une action efficace sans induire d'effets toxiques.

Formes moléculaires proches de l'analyse

Le tacrolimus [3] est intensément métabolisé au niveau hépatique et au niveau de la paroi intestinale par les cytochromes P 450 3A4 et 3A5 ; la molécule est principalement O-déméthylée ou hydroxylée. Sur la Fig. 1, les flèches indiquent les sites de métabolisation.

On a identifié une quinzaine de métabolites avec des propriétés différentes ; le Tableau 1 en donne la liste.

Le tacrolimus est surtout concentré dans les hématies avec des variations importantes du rapport sang total/plasma ; dans le plasma, le tacrolimus est liée à une protéine le FKBP-12.

Cette séquestration intra érythrocytaire est due à la richesse en immunophilines.

En plus des variations de sensibilité entre les différents transplantés, il y a des variations intra individuelles importantes ce qui oblige à un suivi thérapeutique pharmacologique (STP) basé sur la mesure de la concentration sanguine de tacrolimus [3].

Données immuno-analytique utiles

Pré-analytique

Le moment de la mesure de la concentration sanguine fait encore l'objet de discussion [4] ; la mesure de l'aire sous la courbe (AUC des Anglo-Saxons) donne les meilleurs renseignements mais la multiplication des prélèvements et des

dosages est un obstacle pour la pratique quotidienne. Le prélèvement au point le plus bas, c'est-à-dire Co (juste avant la nouvelle prise de médicaments) ne fait plus l'unanimité ; on a proposé des dosages aux temps trois heures, quatre heures, une heure ou huit heures ; la stratégie de la détermination des concentrations C3, C4, C8 semble le mieux se corréliser à un résultat clinique favorable.

Le tacrolimus est souvent associé à d'autres drogues immunosuppressives, ce qui a comme avantage de réduire les doses quotidiennes, mais en revanche de se trouver à des taux sanguins bas, donc avec l'obligation d'utiliser des dosages avec des limites de quantification basses ; avec les nouvelles stratégies de STP la technique doit répondre à une limite de quantification de 1 ng/mL.

La liposolubilité du tacrolimus fait que le produit est largement distribué dans l'organisme. Au niveau sanguin, la molécule est séquestrée dans les érythrocytes, si bien que les dosages se pratiquent sur sang total.

Le prélèvement se fait obligatoirement sur EDTA, avec des tubes en verre sans séparateur.

Les échantillons sont stables :

- au moins quatre jours à température ambiante ;
- sept jours entre +2 et +4 °C ;
- six mois à -20 °C ; les cycles de congélation et de décongélation sont déconseillés.

D'ordinaire, on transporte les tubes en glacière.

Les études sur prélèvements surchargés en triglycérides (8 g/L), en bilirubine (400 mg/L), en acide urique (200 mg/L) montrent une bonne récupération.

Données spécifiques de l'immunodosage

Les immunodosages sont encore les plus utilisés ; toutefois, la présence de plus en plus fréquente de la LC/MS/MS dans les laboratoires permet une utilisation courante de cette technique aux dépens de l'immuno-analyse.

Les techniques immunologiques [5] utilisent toujours une réaction antigène-anticorps (l'antigène étant ici le

Tableau 1 Le tacrolimus, ses métabolites et leurs propriétés respectives.

Tacrolimus et métabolites	Activité pharmacologique : IC50	% de réactivité croisée avec le FK 506	Liaison avec le FKBP12
Tacrolimus (FK506)	0,11	100	100
13-o-demethyltacrolimus (M1)	1,71	0	9,6
31-o-demethyltacrolimus (M2)	0,11	109	14,2
15-o-demethyltacrolimus (M3)		90,5	116
12-hydroxytacrolimus (M4)	3,13	8,8	1,6
15,31-o-didemethyltacrolimus (M5)		92,2	20,5
13,31-didemethyltacrolimus (M6)	8,78	0	1,3
13,15-didemethyltacrolimus (M7)		0	2,3
(M8)	15,27	0	NA

tacrolimus) ; le signal détermine les différentes techniques commerciales :

- MEIA : Microparticle Enzyme Immuno Assay ;
- CMIA : Chemiluminescence Microparticle Immuno Assay ;
- EMIT : Enzyme Multiplied Immuno Assay ;
- ACMA : Antibody Conjugated Magnetic Immuno Assay ;
- CEDIA : Cloned Enzyme Donor Immuno Assay.

Toutes ces techniques, à l'exception de l'ACMA, nécessitent une pré-extraction manuelle avec une précipitation avant de pouvoir rentrer dans la chaîne analytique [5].

Les calibrants permettent d'établir une courbe en cinq ou six points : de 0 à 30 ng/mL.

Ce sont des échantillons de sang humain avec des ajouts d'une solution de tacrolimus préparée à partir d'une poudre de tacrolimus de pureté supérieure ou égale à 98 %. Les conserver, les utiliser suivant les recommandations du fabricant. Après décongélation, ne jamais les recongeler. Toujours les manipuler selon les règles « OSHA Standard on Bloodborne Pathogens » [6].

Avec les nouveaux protocoles de STP, la technique doit répondre à une limite de quantification de l'ordre du nanogramme par millilitre.

Les anticorps sont des anticorps monoclonaux et croisent avec les métabolites, ces dosages introduisent un biais dont il faut avoir connaissance pour le prendre en compte dans le suivi thérapeutique [6].

En plus, la présence d'anticorps hétérophiles a une incidence sur le résultat en particulier avec la technique ACMA due au fait d'un prétraitement automatisé qui n'élimine pas ces anticorps, alors que la précipitation manuelle suivie d'une centrifugation les élimine [7].

Mais d'autres pièges peuvent avoir une influence sur le résultat :

- la valeur de l'hématocrite ;
- la concentration d'albumine de l'échantillon. Cela est vrai pour la technique MEIA.

La firme commerciale doit fournir les résultats de l'interférence possible avec les substances pharmaceutiques de la liste du document EPA7-A2 du CLSI [8].

CV%.

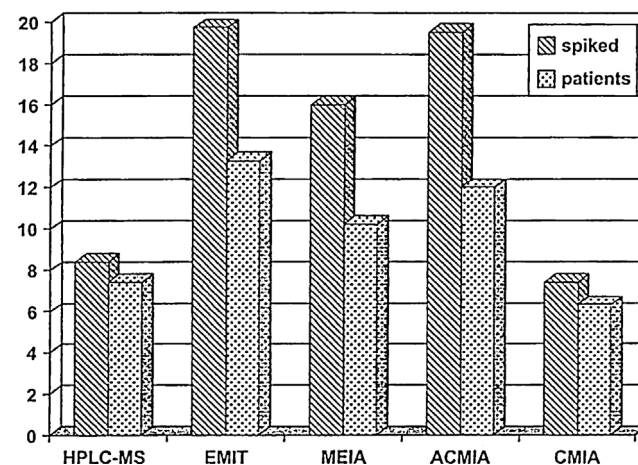


Figure 2 Comparaison des CV des techniques les plus usitées, sur des échantillons de patients ou d'échantillons enrichis en tacrolimus.

On voit sur la Fig. 2 la comparaison des CV des techniques les plus usitées, sur des échantillons de patients ou d'échantillons enrichis en tacrolimus.

La CMIA donne des CV voisins de la LC/MS tant pour les patients que pour les échantillons avec ajouts.

Le STP d'un patient oblige à un suivi avec toujours la même technique.

Il est indispensable pour le laboratoire qui pratique ce dosage d'adhérer à un programme de qualité ; en France sur

Tableau 2 Liste des techniques les plus utilisées par les 54 laboratoires adhérant au programme de contrôle de qualité mis au point par UK-NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service).

Techniques	Nombre de laboratoires
LC/MS	20
CMIA	14
ACMA	14
EMIT 2000	5
CEDIA	1

les 54 laboratoires participant à celui organisé par le UK-NEQAS [9], on a la répartition qui figure dans le [Tableau 2](#).

En conclusion : la technique de dosage doit avoir une limite de quantification voisine de 1 ng/mL, avoir une bonne corrélation avec les dosages en LC/MS, ne pas croiser avec les anticorps hétérophiles pour être un outil performant.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Kino T. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J Antibiot* 1987;40:1249–55.
- [2] Ansermot N. Suivi thérapeutique de la cyclosporine. 2007 Thèse 3912- Hôpitaux universitaires Genève.
- [3] Jusko W. Analysis of Tacrolimus in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995;17:596–601.
- [4] Wallemacq P. Opportunities to optimize Tacrolimus Therapy: report of the European Consensus Conference. *Ther Drug Monit* 2009;31:139–49.
- [5] Wallemacq P. Multi-site analytical evaluation of the Abbott Architect Tacrolimus Assay. *Ther Drug Monit* 2009;31:198–204.
- [6] US Depart of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Bloodborne pathogens.
- [7] Hermida J. Falsely increased blood Tacrolimus concentration using the ACMA assay. *Ther Drug Monit* 2009;2:269–71.
- [8] Mc Enrobe R.J. Interference Testing in Clinical Chemistry. Approved Guideline- second edition CLSI. Document EP7-A2 25(27) 1-105.
- [9] Marquet P. Programme de contrôle externe de qualité. *Ann Biol Clin* 1999;57(3):360–3.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immunoanalytiques de la 5alpha-dihydrotestostérone

Immunoanalytical characteristics of 5alpha-dihydrotestosterone

R. Doggui*, H. Ben Gharbia

Unité études et planification, Institut national de nutrition et de technologie alimentaire, 11, rue Jebel-Lakhdar, 1007 Bab Saadoun-Tunis, Tunisie

Reçu le 9 octobre 2012 ; accepté le 20 décembre 2012

KEYWORDS

Dihydrotestosterone;
Androgen;
Hormone;
Immunoassay;
RIA;
Preanalytical
condition

MOTS CLÉS

Dihydrotestostérone ;
Androgène ;
Hormone ;
Immunodosage ;
RIA ;
Condition
préanalytique

Summary This paper points out biopathological data and clinical interest of dihydrotestosterone. The most commonly immunoassays used to perform both steroid hormones and their precursor assays present lack of precision especially at lower concentrations because of the presence of interfering substances. The same problems exist for dihydrotestosterone quantification. The authors present the best way to optimize the analytical performance of the DHT assay.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Cet article expose les principales données biopathologiques de la dihydrotestostérone (DHT) ainsi que les indications de dosage. La plupart des immunodosages destinés aux hormones stéroïdiennes ainsi que leurs précurseurs présente une précision médiocre à basse concentration à cause principalement des réactions croisées ; ce sera le cas de la DHT. L'article fait le point sur les moyens d'améliorer les performances analytiques.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

La 5alpha-dihydrotestostérone (5alpha-DHT) est l'hormone qui présente la plus grande activité androgénique (environ trois fois supérieure à celle de la testostérone). Son dosage est indiqué au cours de l'exploration de l'hirsutisme chez la femme, de l'hypogonadisme chez l'homme, et des

déficits en 5alpha-réductase. La testostérone (T) est le cross-réactant le plus notable au cours d'un immunodosage. Une quantification directe ne permet pas d'apprécier les vraies valeurs surtout à basse concentration ; une extraction et une purification préalables sont impératives.

Données structurales

La 5alpha-DHT est de masse moléculaire équivalente à 290 Da. Sa nomenclature selon l'International Union of Pure and

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : doggui.radhouene@gmail.com (R. Doggui).

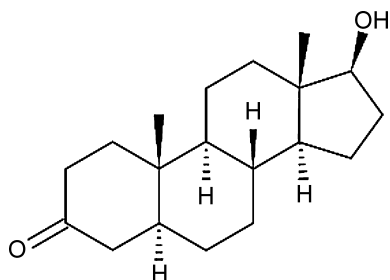


Figure 1 Structure de la dihydrotestostérone.

Applied Chemistry (IUPAC) est la suivante : 5 α -androstane-17 β -ol-3-one. Sa structure est schématisée sur la Fig. 1.

Données métaboliques

La 5alpha-DHT est une hormone androgène non aromatisable. Elle provient de la conversion périphérique de la testostérone sous l'action de la 5alpha-réductase surtout au niveau du foie. Cette enzyme microsomale NADPH-dépendante est localisée au niveau du foie, des follicules pileux, de la peau et des organes génitaux externes. Il existe deux isoenzymes de la 5alpha-réductase 1 et 2, codées respectivement par SRD5A1 et SRD5A2 [1]. Les deux isoenzymes de la 5alpha-réductase catalysent la réduction de la testostérone en 5alpha-DHT. Le finastéride inhibe l'activité de l'isoenzyme 2 et le Dutastéride® inhibe l'activité des isoenzymes 1 et 2. Ces deux médicaments sont utilisés dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate.

Les deux enzymes présentent 60 % d'homologies, mais diffèrent pour certaines caractéristiques physicochimiques d'activité à savoir le pH [2].

La testostérone traverse par simple diffusion la membrane cellulaire de la cellule cible ou elle sera convertie en 5alpha-DHT. Cette dernière se lie au récepteur nucléaire *androgen receptor* (AR) [3]. L'ensemble hormone-récepteur se lie à une troisième molécule *heat shock protein* (HSP) afin d'amener ce complexe ternaire au site d'action nucléaire [3]. La fixation à l'AR peut être inhibée par l'acétate du cyprotérone, qui est un progestatif anti-androgénique agissant comme un inhibiteur compétitif. À forte dose, ce composé inhibe la sécrétion de l'ACTH. La 5alpha-DHT et la testostérone sont toutes les deux des ligands de l'AR. C'est l'existence ou l'absence de la 5alpha-réductase au niveau du tissu cible qui orientera l'action hormonale par l'utilisation de la 5alpha-DHT ou la testostérone.

Une très faible proportion de la 5alpha-DHT existe à l'état libre au niveau de la circulation sanguine (1–2 %) [4]. Le transport plasmatique de la 5alpha-DHT est assuré pour l'essentiel par la *sex hormone binding protein* (SHBP) [5].

La 3alpha-androstanediol est le principal métabolite de la 5alpha-DHT, l'interconversion entre ces deux hormones est possible.

NB : il existe une deuxième forme de la DHT issue de la testostérone : la 5bêta-DHT. Il s'agit d'un métabolite produit strictement au niveau hépatique, inactif et dont la formation est catalysée par la 5bêta-réductase.

Le catabolisme de la 5alpha-DHT implique une première étape de réduction par la 3alpha-hydroxystéroïde déshydrogénase qui aboutit à la formation du 5 α -androstane-3 α ,

17 β -diol. Ce stéroïde va subir une réaction d'oxydation avec la 17bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase la convertissant en androstérone qui peut être soit glucuro- ou sulfoconjuguée au niveau du foie. Ces réactions tentent d'augmenter la solubilité du métabolite pour faciliter son élimination urinaire.

Les effets biologiques les plus remarquables de la 5alpha-DHT sont :

- régulation de la sécrétion de la LH via l'atténuation de la fréquence des pulses de la GnRH ;
- la 5alpha-DHT est réputée stimuler la croissance via l'augmentation locale au niveau du tissu cible de l'*insulin growth factor-1* (IGF-1) [6] ;
- la 5alpha-DHT est responsable de la différenciation des organes génitaux externes et du développement des glandes génitales accessoires ; la prostate (à partir du sinus urogénital) et les vésicules séminales.

Valeurs usuelles

Les valeurs usuelles de la DHT sont indiquées dans le Tableau 1 [7–10]. Le facteur de conversion du ng/dl vers la pmol/l est de 34,4.

Variations physiopathologiques et indications de dosage

Au cours de l'atrésie folliculaire, il y a une baisse de l'aromatisation et donc une baisse de la conversion de la testostérone vers l'œstradiol. Une accumulation de la 5alpha-DHT et la testostérone est observée [11].

Lors d'un syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes par déficit en la 5alpha-réductase ; la 5alpha-DHT se retrouve à des concentrations abaissées. La concentration de la LH est située à la borne supérieure de l'intervalle de référence, alors que la testostérone et la FSH sont normales. Le rapport testostérone/5alpha-DHT de base est voisin de 10 chez les sujets normaux. Chez les patients atteints d'un déficit en 5alpha-réductase, il peut être compris entre 40 et 100 après stimulation par l'hCG (hormone chorionique gonadotrophique). La détermination de ce rapport est l'un des critères de diagnostic de ce syndrome [12].

Par ailleurs, la détermination de la 5alpha-DHT (couplée à celle de la testostérone et de l'androstènedione) peut être utile pour l'exploration de la cryptorchidie chez l'enfant. L'exploration nécessite l'utilisation d'un test de stimulation par la β HCG. Durant le premier jour de l'exploration, un prélèvement sanguin est effectué entre huit et neuf heures pour la détermination des taux de base. Un second prélèvement est opéré au bout de 72 heures après injection de la hCG. Une basse 5alpha-DHT sérique est observée contre une élévation légère de la testostérone et des gonadotrophines en cas de diagnostic de la cryptorchidie. Un rapport testostérone/5alpha-DHT supérieur à 27 après la stimulation par la hCG, plaide en faveur d'un déficit en 5alpha-réductase [7].

L'épuration plasmatique des androgènes et notamment de la testostérone et la 5alpha-DHT diminue. Par conséquent, des valeurs élevées de la 5alpha-DHT et de

Tableau 1 Valeurs usuelles de la 5alpha-dihydrotestostérone plasmatique selon l'âge, le sexe et/ou la situation physiopathologique.

	Sexe masculin (pmol/l)	Sexe féminin (pmol/l)	Technique de dosage	Référence
<i>Âge</i>				
À la naissance	172–2064	—	—	[7]
1 ^{ère} semaine	Abaissement rapide	—		
1–60 jours	413–2924	—		
Avant la puberté (à partir du 7 ^e mois)	< 103	—		
Adulte	1032–2924	158–757		[8]
1–6 mois après la naissance	412–2942	< 172	Purification par CLHP suivie d’une quantification par RIA	
Avant la puberté	< 172	< 172		
Entre le II et III stade de puberté	103,2–1135,2	172,0–653,6		
Entre le IV et V stade de puberté	756,8–2580,0	103,2–1032,0		
<i>Situation physiologique</i>				
Adulte	1650–2070	—	GC-MS	[9,10]
Avant la ménopause	—	200–1500	—	
Après la ménopause	—	100–800		

RIA : radio-immunoanalyse ; CLHP : chromatographie Liquide Haute Performance ; GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

la testostérone peuvent être retrouvées chez les sujets atteints de thyrotoxicose [13].

Le dosage de la DHT pour le monitoring des thérapies à base de finastéride n'est pas préconisé chez les femmes [14].

La 5alpha-DHT n'est pas un bon marqueur de la production périphérique des androgènes car elle est rapidement métabolisée et elle présente une forte affinité à la protéine vectrice. Son métabolite, la 3alpha-androstanediol est un bien meilleur marqueur [4].

NB il est souhaitable que le laboratoire ait connaissance des patients placés sous un traitement inhibiteur de la 5alpha-réductase.

Phase préanalytique

Les anticorps utilisés pour le dosage de la 5alpha-DHT présentent des taux de réactions croisées pouvant atteindre 23 % avec la testostérone. Il est indispensable d'éliminer la testostérone avant de procéder à un dosage. L'extraction de la 5alpha-DHT est effectuée par l'éther di-éthylique le plus souvent. Or, ce solvant organique ne permet pas de séparer la 5alpha-DHT et la T ; il est donc plus judicieux de neutraliser cette dernière en amont de l'extraction (liquide-liquide) à l'aide de permanganate de potassium ; ce composé oxyde la double liaison C₄-C₅ dans la testostérone. [15]. La purification est réalisée sur colonne Célite [16]. Il est indispensable de valider le procédé d'extraction et de purification (par la mesure du taux de recouvrement) par l'utilisation d'un traceur ou d'une solution-mère de concentration connue avant toute application pour le diagnostic ou la recherche. La 5alpha-DHT est stable trois jours à 4 °C et plusieurs mois à -20 °C [10]. Il est recommandé d'éviter les tubes contenant un gel séparateur lors du prélèvement [10].

Techniques d'immunoanalyse

Parmi les techniques d'immunoanalyse la méthode radio-immunologique est la plus utilisée pour le dosage de la 5alpha-DHT. Le traceur couramment employé au cours du dosage compétitif est la ³H-DHT. Les anticorps utilisés sont dirigés contre la DHT couplé à la BSA via un bras (1alpha-carboxy-méthyl) relié à l'hormone en position 1 [17]. Toutefois, d'autres anticorps peuvent être employés et qui sont dirigés contre les formes suivantes : la 5alpha-DHT-6-(O-carboxy-méthyl) oxime-BSA et la 5alpha-DHT-7-(O-carboxy-méthyl) oxime-BSA. La meilleure spécificité est obtenue avec les anticorps dirigés contre la 5alpha-DHT-7-(O-carboxy-méthyl) oxime [18]. Ces anticorps ne présentent pas la spécificité requise pour s'affranchir de la réaction croisée, surtout vis-à-vis de la testostérone qui ne diffère que par la présence d'une double liaison entre le carbone 4 et 5. Il est déconseillé de réaliser des dosages sans extraction et purification préalable [19]. La comparaison de la RIA (dosage direct) avec la LC-MS a révélée des discordances surtout au niveau des basses concentrations [20]. Ces différences sont atténuées par l'utilisation d'une purification sur colonne Célite [20].

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Labrie F. Endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:C113-8.
- [2] Andersson S, Russel DW. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5a-reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3640-4.
- [3] Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* 1991;5:1396-404.
- [4] Stanczyk FZ. Diagnosis of hyperandrogenism: biochemical criteria. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:177-91.
- [5] El Awady MK, Salam MA, Gad YZ, El-Saban J. Dihydrotestosterone regulates sex hormone binding globulin in prepubertal males. *Clin Endocrinol* 1989;30:279-84.
- [6] Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 2005;64:157-65.
- [7] Brook CDG, Dattani MT. Handbook of clinical pediatric endocrinology. 2nd ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2012, 1-368.
- [8] Braunstein GD. Endocrine changes in pregnancy. In: Molmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *William textbook of endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders; 2011. p. 819-1233.
- [9] Giton F, Fiet J, Cornu JN, Cussenot O, Bélanger A, Urien S, et al. Serum sex steroids measured in middle-aged European and African-Caribbean men by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur J Endocrinol* 2011;165:917-24.
- [10] Guéchet J. Dihydrotestostérone. EMC - Biologie clinique 2003 [90-10-0400].
- [11] Turpin AL. Anatomie, embryologie et histologie de l'ovaire. EMC - Endocrinologie-Nutrition 1995 [10-026-A-10].
- [12] Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE. Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974;186:1213-5.
- [13] Salvatore D, Davies TF, Schlumberger MJ, Hay ID, Larsen PR. Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: Molmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *William textbook of endocrinology*. 12th ed. Philadelphia, USA: Elsevier Saunders; 2011. p. 327-475.
- [14] Rittmaster RS. Finasteride. *N Engl J Med* 1994;330:120-5.
- [15] Puri V, Puri CP, Anand Kumar TC. Serum levels of dihydrotestosterone in male rhesus monkeys estimated by a non-chromatographic radioimmunoassay method. *J Steroid Biochem* 1981;14:877-81.
- [16] Giton F, Guéchet J, Fiet J. New reusable Celite/ethylene glycol cartridges for selective chromatography of steroids before immunoassay. *Clin Biochem* 2009;42:1735-8.
- [17] Fiet J, Galons H, Villette JM, Boudou P, Guéchet J, Gueux B, et al. Problèmes particuliers posés par l'immunodosage des stéroïdes. *Immunoanal Biol Spec* 1994;9:285-92.
- [18] Condom R, Desfosses B. The preparation of three 5-dihydrotestosterone-BSA conjugates: a comparison of the antigen properties. *J Steroid Biochem* 1977;8;1085-90.
- [19] Nonnenmacher L. Informations réactifs: androstènedione, dihydrotestostérone, estriol et estrone. *Immunoanal Biol Spec* 2003;18:166-71.
- [20] Wang C, Shiraishi S, Leung A, Baravarian S, Hull L, Goh V, et al. Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid chromatography tandem mass spectrometry assay: interference and comparison with established methods. *Steroids* 2008;73:1345-52.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques de l'ADAMTS 13

Immuno-analysis characteristics of ADAMTS 13

Y. Jourdy*, S. Le Quellec*, C. Nougier

Laboratoire d'hémostase, hôpital Edouard-Herriot, 5, place d'Arsonval, 69437 Lyon cedex 3, France

Reçu le 9 janvier 2013 ; accepté le 19 janvier 2013

KEYWORDS

ADAMTS 13;
ADAMTS 13 assays;
Anti-ADAMTS 13
autoantibodies;
Thrombotic
thrombocytopenic
purpura;
Upschaw-Schulman
syndrome

MOTS CLÉS

ADAMTS 13 ;
Dosage de
l'ADAMTS 13 ;
Anticorps
anti-ADAMTS 13 ;
Purpura
thrombotique throm-
bocytopénique ;
Syndrome
d'Upschaw-Schulman

Summary Beside structural and physiological ADAMTS 13 data, this paper points out the main features of ADAMTS 13 assays and their interest in several clinical situations.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé Après un rappel sur la structure et la synthèse de l'ADAMTS 13, cet article décrit les caractéristiques principales des différentes techniques existantes pour explorer l'ADAMTS 13 ainsi que leur intérêt dans différentes situations cliniques.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Physiologie de l'ADAMTS 13

Structure et fonction de l'ADAMTS 13

L'ADAMTS 13 est le 13^e élément de la famille des métalloprotéases A Disintegrin A Metalloprotease with Thrombospondine type 1 repeats (ADAMTS). C'est une glyco-

* Auteurs correspondants.

Adresses e-mail : yohann.jourdy@chu-lyon.fr (Y. Jourdy),
sandra.le-quellec@chu-lyon.fr (S. Le Quellec).

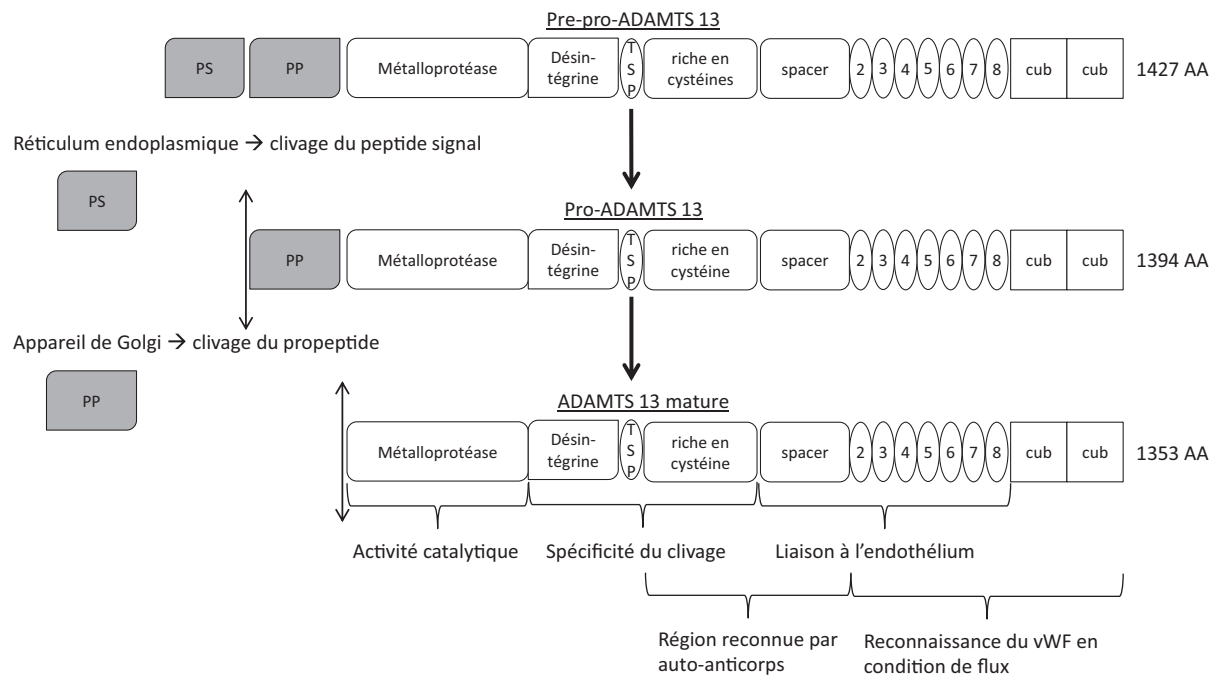


Figure 1 Domaines structuraux et fonctionnels de l'ADAMTS 13. L'ADAMTS 13 est une glycoprotéine monocaténaire composée de la succession des domaines structuraux suivants : un peptide signal (PS), un propeptide (PP), un domaine métalloprotéase, un domaine désintégrine, un premier domaine thrombospondine de type 1 (TSP), un domaine riche en cystéine, un domaine *spacer*, une succession de sept domaines de type TSP-1 et deux domaines CUB. La partie N-terminale d'ADAMTS 13 (allant du domaine métalloprotéase jusqu'au domaine *spacer* inclus) est indispensable au clivage du facteur von Willebrand (vWF) in vitro et in vivo. La partie C-terminale n'est pas indispensable à ce clivage in vitro mais elle l'est probablement in vivo puisqu'elle est indispensable à la liaison d'ADAMTS 13 au vWF, d'une part, et à son récepteur endothélial, le CD36, d'autre part [1].

protéine monocaténaire de 190 kDa dont 45 kDa de chaînes glycosylées. La protéine mature est constituée d'un domaine métalloprotéase, de huit domaines thrombospondine de type 1 (TSP-1), d'un domaine riche en cystéines, d'un domaine de type ADAMTS *spacer*, et de deux domaines CUB (Fig. 1).

L'ADAMTS 13 régule l'activité du facteur von Willebrand (vWF) en réduisant la taille de ses multimères par clivage protéolytique. Le clivage a lieu au niveau du pont peptidique Tyr1605-Met1606 situé dans le domaine A2 du vWF. Grâce au clivage du vWF par l'ADAMTS 13, les multimères de vWF de très haut poids moléculaires (MHPM) très adhésifs vis-à-vis des plaquettes sont absents, et la formation du clou plaquettaire en réponse à une brèche vasculaire est limitée. À ce jour, le vWF est le seul substrat connu d'ADAMTS 13.

Le domaine métalloprotéase ne suffit pas à lui seul pour assurer l'activité catalytique de l'ADAMTS 13, cette activité requiert la présence d'un domaine riche en cystéine et d'un domaine *spacer*. La région C-terminale de l'ADAMTS 13 (domaines TSP-1 et CUB) n'est pas indispensable à l'activité catalytique mais permettrait la spécificité de liaison de l'ADAMTS 13 au vWF et aux cellules endothéliales [1].

Biosynthèse

L'ADAMTS 13 est codée par un gène de 37 kb situé sur le chromosome 9q34 ; 29 exons codent pour un ARNm de 4,6 kb. Bien que son ARNm ait été identifié dans de nombreux organes (cœur, pancréas, poumon, reins, cerveau),

l'ADAMTS 13 est essentiellement synthétisée par les cellules stellaires d'Ito au niveau du foie, les cellules endothéliales et les cellules de la lignée mégacaryocytaire.

L'ADAMTS 13 est d'abord synthétisée sous forme d'une pré-pro-protéine de 1427 acides aminés (Fig. 1). Au cours de son transit intercellulaire elle subit diverses modifications post-traductionnelles. Au niveau du réticulum endoplasmique, le peptide signal de 33 acides aminés est clivé et la protéine subit des N-glycosylations. Puis le clivage du propeptide de 41 acides aminés, bien que non indispensable pour la structure, la sécrétion ou l'activité de la protéine, se fait au cours du transit à travers l'appareil de Golgi. La protéine mature contient 1353 acides aminés. Elle est sécrétée dans le plasma sous forme active. L'ADAMTS 13 est présente en très faible quantité dans le plasma sous forme libre ($\sim 1 \mu\text{g/mL}$) [1].

Demi-vie

La demi-vie de l'ADAMTS 13 dans le plasma est de deux à trois jours [1].

Régulation

La régulation de l'activité de l'ADAMTS 13 sur le vWF dépend de deux mécanismes. Premièrement, l'accessibilité du site de clivage du vWF est modulée in vivo par les conditions de flux sanguins et par la liaison du vWF à certaines molécules

membranaires. En l'absence de force de cisaillement suffisante, le vWF est présent dans le plasma sous forme globulaire et le site de clivage spécifique, le pont peptidique Tyr1605-Met1606, est masqué. Les forces de cisaillement élevées étire la molécule de vWF et expose le site de clivage. De plus, la liaison du vWF à la P-sélectine des surfaces cellulaires endothéliales ou à la GPIb plaquettaire va aussi faciliter l'accès de l'ADAMTS 13 au site de clivage. Ces derniers mécanismes vont permettre respectivement de limiter la taille des multimères avant la mise en circulation de vWF et de favoriser la résorption du clou plaquettaire une fois la brèche vasculaire cicatrisée.

Deuxièmement, des facteurs plasmatiques sont aussi capables de réguler l'activité de l'ADAMTS 13 : la thrombine, le FXa, l'élastase leucocytaire et la plasmine peuvent dégrader l'ADAMTS 13.

Dosage de l'ADAMT 13

Étapes pré-analytiques

Le prélèvement veineux doit être réalisé au pli du coude sur tube citraté 0,109M ou sur tube sec. Les tubes doivent être centrifugés 2000 à 2500 g pendant 20 minutes dans un délai maximum de quatre heures après le prélèvement. Si l'analyse n'est pas effectuée immédiatement, le plasma ou le sérum doit être décanté et congelé à -20 ou -80°C . Les prélèvements sur EDTA doivent être proscrits pour une mesure de l'activité car cet anticoagulant inhibe l'activité de l'ADAMTS 13.

Techniques de dosage de l'activité de l'ADAMTS 13

Ces techniques sont fondées sur le clivage du vWF. Le vWF peut être sous forme de multimères ou sous forme d'un peptide de synthèse comprenant le domaine de clivage du vWF par l'ADAMTS 13. Les produits de clivage du vWF sont ensuite détectés directement ou indirectement [2]. Tous ces dosages mesurent l'activité de l'ADAMTS 13 dans des conditions statiques. Ils ne reflètent pas les conditions physiologiques de flux permettant le changement de conformation du vWF nécessaire à une action optimale de l'ADAMTS 13.

Techniques utilisant comme substrat le vWF natif

Le substrat peut être du vWF sous forme de concentrés purifiés à partir de plasma de donneurs ou du vWF recombinant. Dans un premier temps, le vWF subit une étape de dénaturation (urée 1,5M ou guanidine 0,15M) afin de faciliter l'action de l'ADAMTS 13. L'ADAMTS 13 est activée par ajout d'un cation bivalent, qui est le plus souvent le BaCl_2 . La durée de la protéolyse est variable et longue (six à 24 heures selon les techniques). L'activité de l'ADAMTS 13 sur le vWF peut être évaluée de manière directe par électrophorèse en gel SDS-agarose suivie d'un immunoblot à la recherche de la persistance des multimères de vWF ou de la présence de produits de clivage du vWF (fragments de 140 et 176 kDa) ; ou de manière indirecte en mesurant l'activité résiduelle du

vWF (activité cofacteur de la ristocétine ou test de liaison au collagène).

Ces méthodes sont assez sensibles (limite de détection : 3 à 6 % activité ADAMTS 13) et reproductibles. Néanmoins, elles sont très consommatrices en temps (deux à trois jours) et sont donc difficilement applicables pour une activité de routine. De plus, l'utilisation d'un agent dénaturant pour favoriser l'action de l'ADAMTS 13 pourrait diminuer artificiellement son activité et modifier les interactions ADAMTS 13-Anticorps (Ac) [2,3]. Aucune de ces méthodes n'est actuellement commercialisée.

Techniques utilisant comme substrat un peptide

Ce sont actuellement les plus nombreuses. Le substrat est un peptide de synthèse. Il est composé, soit du domaine A2 entier du vWF, soit d'une partie de ce domaine contenant le site de clivage spécifique de l'ADAMTS 13 (peptides de 73 à 78 acides aminés). Ces techniques ne nécessitent pas l'action d'un agent dénaturant. La durée de protéolyse est raccourcie (de 30 minutes à trois heures). La dégradation du peptide est évaluée, soit de manière directe (Western blot avec étude des fragments de clivage du vWF A2), soit de manière indirecte par des techniques chromogéniques (HRP assay, Elisa) ou fluorogéniques (*fluorescence resonance energy transfert* [FRET]) [2,4].

Dans l'HRP assay, le substrat utilisé est un peptide de synthèse de 73 acides aminés sur lequel est fixée une peroxydase sur une extrémité et une molécule de biotine (HRP-vWFA2-73-biotine) sur l'autre extrémité. Après incubation en présence du sérum ou plasma du patient, des molécules de streptavidine fixées sur des particules d'agarose sont ajoutées. Les peptides non clivés vont se lier aux particules d'agarose et vont être éliminés après centrifugation. L'étape de révélation se fait par ajout d'un substrat chromogène de l'HRP et mesure de l'Absorbance. L'Absorbance sera proportionnelle à l'activité de l'ADAMTS 13 [5].

Plusieurs méthodes Elisa ont été développées. Le substrat est un peptide de synthèse de 73 acides aminés sur lequel est fixé sur l'une de ses extrémités une glutathion-S-transferase (GST) et sur l'autre extrémité des résidus histidines (GST-vWFA2-73-His). Des Ac polyclonaux anti-GST sont fixés au fond des puits de réaction. Après incubation avec le sérum ou le plasma du patient et lavage, un deuxième Ac monoclonal de révélation couplé à l'HRP est ajouté. L'Ac peut être dirigé, soit contre un des produits de la protéolyse, dans ce cas l'activité sera proportionnelle à la mesure d'absorbance, soit contre les résidus histidines, c'est-à-dire les peptides non clivés, alors l'activité sera inversement proportionnelle à la mesure de l'absorbance. La révélation se fait par ajout d'un substrat chromogène de l'HRP et mesure de l'Absorbance.

La technique FRET utilise un peptide de 73 acides aminés sur lequel sont fixés de part et d'autre du site de clivage un fluorophore et un *quencher* (FRET-vWFA2-73). Après ajout du sérum à tester, la fluorescence émise à 450 nm (après excitation à 350 nm) est mesurée à intervalle régulier durant toute la durée de la réaction. Lorsque l'ADAMTS 13 va cliver le peptide, il va y avoir séparation du fluorophore et du

Tableau 1 Kits commerciaux disponibles pour le dosage de l'ADAMTS 13 [1,2].

Kits commerciaux	Méthodes de détection	
Actifluor™ ADAMTS 13 activity assay	Activité d'ADAMTS 13	Substrat
ATS-13® activity assay	VWF86-Alexa FRET	VWF-86aa
Technozym® ADAMTS 13 activity Elisa	FRET (VWF-73aa clivé)	VWF-73aa
	Elisa (VWF-73aa clivé)	VWF-73aa
Technozym® ADAMTS 13	ADAMTS 13 Antigène	Ac anti-ADAMTS 13
Technozym® ADAMTS 13 Antigen	Elisa (chromogénique)	—
	Elisa (chromogénique)	1 Ac monoclonal et 1 Ac non spécifié
Imubind® ADAMTS 13 Elisa	Elisa (chromogénique)	1 Ac monoclonal et 1 Ac polyclonal de lapin biotynilé
Human ADAMTS 13 Elisa KIT	Elisa (chromogénique)	2 Ac polyclonaux
	Détection et titrage des Ig anti-ADAMTS 13	Ag ADAMTS 13 et Ac anti-ADAMTS 13
Technozym® ADAMTS 13 INH	Elisa (chromogénique)	ADAMTS 13 recombinante
		IgG antihumaine couplée à la peroxydase
Imubind® ADAMTS 13 Autoantibody Elisa	Elisa (chromogénique)	ADAMTS 13 recombinante
		IgG antihumaine couplée à la peroxydase

Elisa : *enzyme linked immunosorbent assay* ; FRET : *fluorescence resonance energy transfert* ; Ac : anticorps ; VWF-86aa : fragment peptidique du facteur von Willebrand de 86 acides aminés ; VWF-73aa : fragment peptidique du facteur von Willebrand de 78 acides aminés.

quencher et donc émission de fluorescence. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'activité de l'ADAMTS 13 [6].

Il est à noter qu'une technique utilisant la spectrométrie de masse (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight [SELDI-TOF]) a été développée, cette dernière serait très sensible et permettrait de diminuer la limite de détection à 0,5 % [7].

Toutes ces méthodes sont très sensibles (LD 1 à 3 %), reproductibles, facilement et rapidement réalisables (une à quatre heures) [2]. Des kits commerciaux utilisant les techniques chromogéniques et FRET sont déjà disponibles (Tableau 1). Une analyse multicentrique récente montre que les techniques utilisant des peptides de synthèse ont des performances analytiques supérieures aux techniques utilisant le vWF natif [4]. Néanmoins, les techniques avec peptides de synthèse ne sont pas sensibles aux mutations touchant les domaines de liaison de l'ADAMTS 13 au vWF ainsi qu'aux Ac dirigés contre ces domaines ; dans ce cas, un dosage d'activité utilisant du vWF natif s'impose.

Quelle que soit la méthode utilisée, les normes de l'activité de l'ADAMTS 13 se situent entre 50 et 150 % (exprimées par rapport à un mélange de plasma normaux) [1].

Interférences analytiques avec les mesures d'activité

Il a été démontré qu'un taux de vWF endogène supérieur à 300 UI/dL interfère pour les dosages utilisant du vWF natif. Le dosage sur prélèvement hémolysé doit être proscrit car l'hémoglobine inhibe l'activité de l'ADAMTS 13 [8]. Une

hyperbilirubinémie supérieure à 100 µmol/L interfère avec les dosages utilisant la technique FRET [9].

Techniques de dosage de l'ADAMTS 13 antigène

Plusieurs tests Elisa utilisant différents Ac monoclonaux ou polyclonaux sont disponibles sur le marché (Tableau 1) pour quantifier le taux d'ADAMTS 13 antigène. Leurs performances analytiques sont très variables notamment pour la reconnaissance des ADAMTS 13 mutantes. De plus, les performances de ces tests en présence d'auto-Ac anti-ADAMTS 13 ou de complexes immuns sont encore mal connues.

Techniques de dosage des anticorps anti-ADAMTS 13

Deux types d'Ac anti-ADAMTS 13 ont été décrits : les Ac neutralisants inhibant l'activité de l'ADAMTS 13 et les Ac non neutralisants accélérant la clairance plasmatique de l'ADAMTS 13. Les deux types d'Ac peuvent être présent simultanément chez un patient.

Les Ac neutralisants peuvent être titrés par la technique de Bethesda (mesure de l'activité résiduelle d'ADAMTS 13 d'un mélange de plasma témoin et de plasma patient préchauffé à 56 °C afin de dissocier les éventuelles complexes immuns), néanmoins cette méthode est semi quantitative et manque de sensibilité [2].

Des techniques permettant de détecter à la fois les Ac neutralisants et non neutralisants de type IgG, IgA et IgM ont été développées (Elisa et Western blot). Le Western blot, bien qu'apparemment plus sensible que les méthodes Elisa

[2], n'est pas une méthode quantitative. Seules les techniques Elisa permettant de titrer les IgG anti-ADAMTS 13 sont commercialisées. Ces techniques utilisent comme Ag du vWF natif recombinant et la révélation se fait grâce à des Ac anti-IgG humaine. Les seuils de positivité sont définis par le fabricant et sont compris entre de 10 à 15 U/mL mais il est recommandé que chaque laboratoire redéfinisse son propre seuil à l'aide d'une population de volontaires sains.

Intérêts cliniques

Bien qu'il existe quelques variabilités physiologiques et pathologiques du taux plasmatiques d'ADAMTS 13, les dosages de l'activité ADAMTS 13 et des anticorps anti-ADAMTS 13 prennent tout leur intérêt dans le diagnostic étiologique d'un purpura thrombotique thrombocytopénique.

Variabilité physiologique et pathologique de l'ADAMTS 13

Les taux d'ADAMTS 13 varient en sens inverse du taux de vWF. Toutes les situations entraînant une augmentation du vWF sont associées à une diminution de l'activité circulante de l'ADAMTS 13. Chez les nouveau-nés et les personnes âgées, les taux d'ADAMTS 13 sont 10 à 20 % plus bas que chez la population générale. Chez la femme enceinte, l'activité de l'ADAMTS 13 diminue progressivement à partir de la 12^e semaine d'aménorrhée pour atteindre un taux 15 à 20 % inférieur au taux de base. Un polymorphisme de l'ADAMTS 13 fréquent dans la population japonaise (P475S), mais non retrouvé chez les caucasiens, est responsable d'une diminution de l'activité de l'ADAMTS 13 [1].

Inversement, les sujets du groupe sanguin O ont une activité circulante de l'ADAMTS 13 supérieure de 10 % par rapport à la population générale.

De nombreuses situations cliniques sont responsables d'un déficit partiel en ADAMTS 13 définie par des valeurs d'activité comprises entre 20 à 50 %. Parmi ces situations, on retrouve des pathologies cardiovasculaires (infarctus du myocarde, hypertension artérielle maligne), choc septique, hépatopathies, syndrome des antiphospholipides, certaines microangiopathies thrombotiques (MAT) comme le HELLPS syndrome ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Quelle que soit la pathologie concernée, la pertinence clinique de ce déficit n'est pas encore établie [1].

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)

Le déficit sévère en ADAMTS 13 (activité < 10 %) [1] est spécifique du PTT. Ce type de microangiopathie thrombotique (MAT) est caractérisé par la présence de MHPM de vWF dans la circulation entraînant la formation spontanée de thrombi-plaquettaires à l'origine de l'obstruction de la microcirculation. Dans 90 % des cas, cette accumulation de MHPM est due à un déficit sévère en ADAMTS 13.

Le PTT est défini par une anémie hémolytique mécanique, une thrombopénie de consommation et des signes d'ischémie viscérale touchant préférentiellement le rein et

le cerveau. C'est une maladie rare dont l'incidence est estimée à 4 cas pour 1 million de personnes par an. Le déficit en ADAMTS 13 peut être héréditaire à transmission autosomique récessive (maladie d'Upshaw-Schuman) mais un déficit acquis est beaucoup plus fréquent. Le déficit acquis est dû à la présence d'auto-Ac anti-ADAMTS 13. Il touche préférentiellement l'adulte jeune (30 à 40 ans) avec une nette prédominance féminine (deux femmes pour un homme). L'évolution se fait habituellement par une alternance de poussées et de périodes de rémission. Dans 50 % des cas aucune cause n'est mise en évidence et le PTT est dit idiopathique. Dans les autres cas, le PTT peut survenir dans un contexte de maladie auto-immune, de néoplasie, de grossesse, de prise de médicaments (i.e ticlopidine, clopidogrel) ou de greffe d'organe.

Avant 1990 la mortalité était de 90 % ; depuis l'utilisation de la plasmathérapie, elle a été réduite à 10 %.

Place de l'exploration de l'ADAMTS 13 dans le diagnostic de purpura thrombotique thrombocytopénique

ADAMTS 13 activité

Le dosage de l'activité circulante de l'ADAMTS 13 est l'examen de première intention à réaliser devant toute poussée aiguë de MAT. Une activité inférieure à 10 % permettra le diagnostic de PTT. Une valeur supérieure à 10 % orientera plutôt vers une cause de déficit modéré en ADAMTS 13 sans exclure pour autant un PTT (10 % des cas ne seraient pas liés à un déficit en ADAMTS 13).

Lors des phases de rémission clinique, la remontée de l'activité de l'ADAMTS 13 au-dessus de 10 % orientera vers un déficit acquis et une normalisation serait un marqueur de bon pronostic. Au contraire la persistance d'une activité basse serait un marqueur prédictif de rechute en cas d'association à des Ac anti-ADAMTS 13 détectables. Un PTT héréditaire doit être évoqué dans le cas d'une activité basse persistante durant les phases de rémission clinique en l'absence d'Ac détectable, et une étude génétique devra être proposée. Un PTT acquis ne peut néanmoins être écarté dans cette situation.

Anticorps anti-ADAMTS 13

La détection des Ac anti-ADAMTS 13 est l'examen de seconde intention dans le cadre des MAT aiguës avec une activité ADAMTS 13 diminuée. Leur présence affirme le PTT acquis, mais leur absence ne l'exclut pas. Dans ce dernier cas, un dosage de l'activité de l'ADAMTS 13 durant une période de rémission pourra permettre de poser le diagnostic de PTT acquis en cas d'augmentation de cette dernière.

ADAMTS 13 antigène

La place de ces tests n'est pas encore clairement établie dans la stratégie diagnostique d'un PTT.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Veyradier A, Coppo P. ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease. *Med Sci* 2011;27(12):1097–105.
- [2] Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010;8(4):631–40.
- [3] Palla R, Valsecchi C, Bajetta M, Spreafico M, De Cristofaro R, Peyvandi F. Evaluation of assay methods to measure plasma ADAMTS 13 activity in thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost* 2011;105(2):381–5.
- [4] Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, Palla R, Afrasiabi A, Canciani MT, et al. Second international collaborative study evaluating performance characteristics of methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J Thromb Haemost* 2008;6(9):1534–41.
- [5] Wu JJ, Fujikawa K, Lian EC, McMullen BA, Kulman JD, Chung DW. A rapid enzyme-linked assay for ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006;4(1):129–36.
- [6] Kremer Hovinga JA, Mottini M, Lämmle B. Measurement of ADAMTS-13 activity in plasma by the FRETs-VWF73 assay: comparison with other assay methods. *J Thromb Haemost* 2006;4(5):1146–8.
- [7] Jin M, Cataland S, Bissell M, Wu HM. A rapid test for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura using surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF)-mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2006;4(2):333–8.
- [8] Studt JD, Kremer Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, et al. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS 13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS 13 activity by hemoglobin. *Blood* 2005;105(2):542–4.
- [9] Meyer SC, Sulzer I, Lämmle B, Kremer Hovinga JA. Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRETs-VWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost* 2007;5(4):866–7.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques de l'alpha fœtoprotéine

Immunoanalytical characteristics of alpha foetoprotein

C. Desbene*, O. Gaillard

Pôle de biologie pathologie, laboratoire de biochimie, centre hospitalier Le Mans, 194, avenue Rubillard, 72037 Le Mans cedex 9, France

Reçu le 6 janvier 2013 ; accepté le 19 janvier 2013

KEYWORDS

Alpha foetoprotein;
Liver;
Testis;
Cancer;
Pregnancy

MOTS CLÉS

Alpha fœtoprotéine ;
Foie ;
Testicule ;
Cancer ;
Grossesse

Summary Besides structural and physiological data of alpha foetoprotein, this paper points out the optimal conditions for sampling, assays and interpretation of results.
© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Après les caractéristiques structurales et physiologiques de l'alpha fœtoprotéine, les données pré-, per- et postanalytiques de son dosage sont abordées pour l'interprétation des résultats.
© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Analyte intact

Structure de l'analyte

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est une glycoprotéine oncofœtale, découverte en 1956 par Bergstrand et Czar. Cette glycoprotéine appartient à la superfamille des albuminoïdes, qui comprend également l'albumine, la protéine Gc globuline (protéine de liaison à la vitamine D) et l'alpha

albumine (encore appelée afamine, capable de lier la vitamine E).

La masse moléculaire de l'AFP est comprise entre 69 et 73 kDa, selon le contenu en résidus glucidiques de la protéine. L'AFP présente en effet une grande hétérogénéité de glycosylation, comportant 4 à 5 % de chaînes glycanes.

L'AFP est constituée d'une chaîne polypeptidique unique, comprenant 590 acides aminés et comportant 15 ponts disulfures (Fig. 1 et 2A). Ces ponts permettent le repliement de la chaîne peptidique et confèrent ainsi à la protéine une forme en U. Le repliement de la chaîne peptidique définit trois domaines, lesquels présentent 35 % de similitude entre eux. L'existence de ces trois domaines a été confirmée par des études de cristallographie aux

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : cdesbene@ch-lemans.fr (C. Desbene),
ogaillard@ch-lemans.fr (O. Gaillard).



Figure 1 Structure de l'alpha fœtoprotéine. D'après Mizejewski, 2001 [5].

Structure of alpha foetoprotein. From Mizejewski, 2001 [5].

rayonsX (Fig. 2B). Les domaines 1 et 2 présentent une plus grande hétérogénéité interspèce que le domaine 3, qui est beaucoup plus conservé chez les mammifères. Les domaines 1 et 2 possèdent des sites de liaison pour différents ligands comme la bilirubine et les acides gras. Le domaine 2 contient également des séquences d'acides

aminés similaires aux domaines d'adhésion à la matrice extracellulaire. Il comporte enfin un site de glycosylation sur des résidus asparagine. Le domaine 3 contient un site de liaison aux composés hydrophobes, ainsi qu'un motif potentiel de dimérisation. Cette structure particulière est également retrouvée chez les autres membres de la superfamille des albuminoïdes.

L'AFP pourrait également adopter une conformation partiellement dénaturée, appelée *molten globule form*, dans certaines conditions de dénaturation modérée, tant in vitro (abaissement du pH, augmentation de la force ionique...) qu'in vivo (ablation d'un ligand, mutation ponctuelle d'un acide aminé, rupture d'un pont disulfure...). Cet état correspond à un état de repliement intermédiaire de la chaîne peptidique, entre l'état natif et l'état dénaturé.

L'AFP a été mise en évidence dans les milieux biologiques sous forme de mono-, di- et trimères.

Variants moléculaires

Des variants moléculaires de l'AFP ont été rapportés depuis longtemps dans la littérature : les premières études ont permis de mettre en évidence des différences de point isoélectrique (pHi) [1] et de capacités de liaison aux lectines [2]. Ces propriétés physicochimiques différentes ne résultent pas d'une modification de la séquence en acides aminés, mais d'une glycosylation variable de la protéine. L'AFP humaine possède, en effet, un site de glycosylation au niveau de l'asparagine 232, sur le domaine 2. La nature du glycane rattaché à la chaîne peptidique varie selon l'organe producteur. En effet, ce résidu glucidique de l'AFP n'est pas codé génétiquement, mais dépend de l'équipement enzymatique de glycosylation, présent dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant, ces

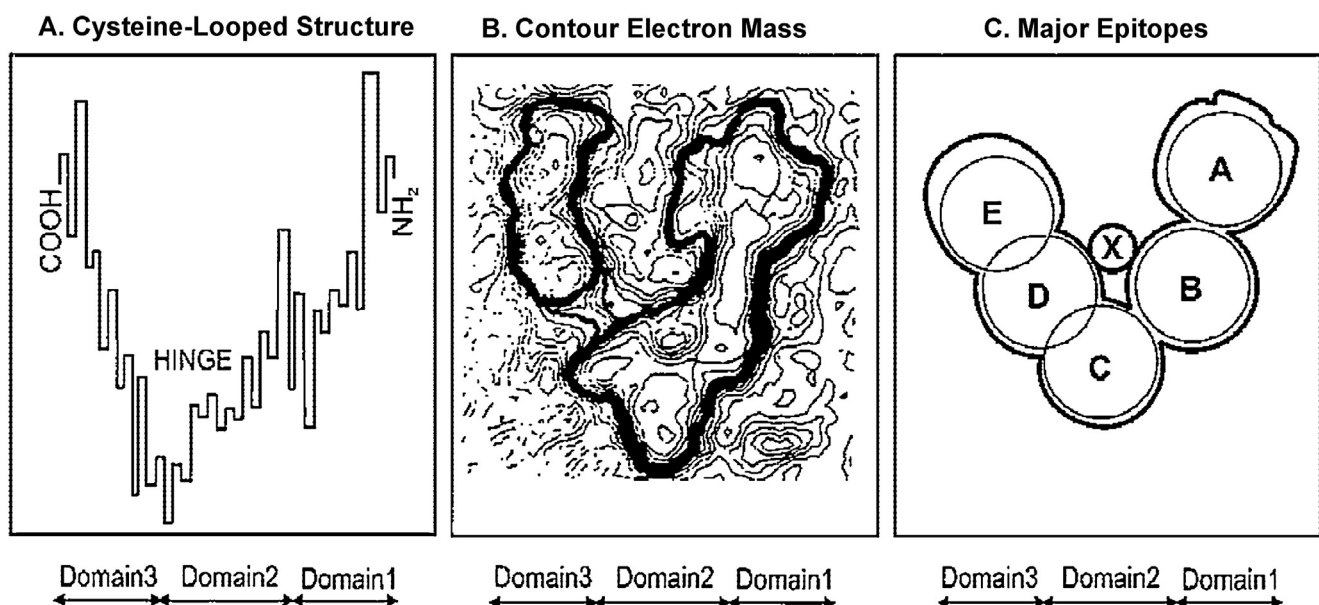


Figure 2 Représentation schématique, cristallographique et épitopique de l'alpha fœtoprotéine. Remarquer la structure repliée avec les trois domaines de la chaîne peptidique (images A et B) et les six domaines épitopiques de la protéine (image C). D'après Mizejewski, 2001 [5].

Schematic, crystallographic and epitopic structure of alpha foetoprotein. From Mizejewski, 2001 [5].

enzymes présentent des distributions spécifiques d'organes. Les molécules d'AFP produites par les différents organes et dans différentes conditions physiologiques ou pathologiques posséderont donc la même séquence peptidique et les mêmes caractéristiques antigéniques. Ainsi, la micro-hétérogénéité des molécules, résultant des variations de la partie glucidique, se traduira par des différences de liaison aux lectines et des comportements différents dans certaines conditions de pH, résultant des différences de pHi. Différentes isoformes peuvent ainsi être mises en évidence selon le comportement électrophorétique, chromatographique ou l'affinité vis-à-vis de différentes lectines (les lectines les plus utilisées pour caractériser les variants de l'AFP sont la concanavaline A, l'agglutinine de *Lens culinaris* et de *Vicia faba*). L'utilisation de techniques d'affinité, couplant l'immuno-électrophorèse et l'affinité aux lectines, a permis la mise en évidence de plus de dix glycoformes de l'AFP [3].

Ainsi, l'AFP présente dans le liquide amniotique est constituée d'un mélange d'isoformes pouvant lier ou non la concanavaline A, lesquelles dérivent du sac vitellin et du foie, respectivement. La proportion respective de ces variants dépendra de l'âge gestationnel. Le variant ne liant pas la concanavaline A sera diminué en cas d'anomalies de fermeture du tube neural.

De même, le glycane de la molécule d'AFP produite par des tumeurs variera selon le type tumoral. Ainsi, l'étude du résidu glucidique de l'AFP constitue un outil intéressant pour le diagnostic des tumeurs : la réactivité de l'AFP vis-à-vis de la concanavaline A permet de différencier les tumeurs du sac vitellin de celles du tractus gastro-intestinal. La fucosylation de l'AFP distingue le carcinome hépatocellulaire (CHC) des maladies bénignes du foie.

Des isoformes de l'AFP ont par la suite été identifiées grâce aux techniques de focalisation isoélectrique. Celles-ci permettent de mettre en évidence, à la fois dans des tumeurs hépatiques et dans les sérums fœtaux, deux isoformes majeures de l'AFP, dont les pHi sont de 4,8 et 5,2. Le prétraitement de la protéine par la neuraminidase produit une seule fraction homogène, dont le pHi est de 5,2. Le contenu en acides gras semble expliquer cette différence de pHi : l'isoforme de pHi 4,8 contient 2,4 mol d'acides gras/mol de protéine, alors que l'isoforme de pHi 5,2 en est totalement dépourvue. Le sang de cordon ombilical contient trois isoformes : une de pHi 4,5 (52 %), une autre de pHi 4,7 (43 %) et un isovariant minoritaire de pHi inférieur à 4,0. L'isoforme de pHi 5,2 n'a pas été retrouvée dans le sang de cordon.

Des variants génétiques de l'AFP ont également été mis en évidence, principalement chez les rongeurs, différant dans la taille de leurs ARN messagers. Ces différents variants peuvent être retrouvés au cours du développement fœtal ou périnatal, ou dans des circonstances telles que la carcinogénèse ou la régénération tissulaire.

Enfin, de fortes concentrations en ligands hydrophobes, notamment en acides gras et en estrogènes, peuvent induire des modifications de la structure tertiaire de l'AFP.

Gène codant pour l'alpha-fœtoprotéine

Le gène codant pour l'AFP est situé sur le bras long du chromosome 4, dans la région 4q11-q22. Il est disposé en tandem

avec les gènes de l'albumine et des autres membres de la superfamille des albuminoïdes au niveau de cette région. Le gène de l'AFP comporte 15 exons et 14 introns [4]. Le promoteur du gène de l'AFP répond à différents facteurs de transcription, dont un récepteur nucléaire homologue au gène *FTZ-F1* de la drosophile. De nombreux ARNm messagers de l'AFP ont été décrits in vitro, mais leurs produits de traduction n'ont pas tous été retrouvés in vivo. Le transcrit principal du gène de l'AFP avoisine 2,2 kilobases (kb), tant dans un contexte fœtal que tumoral. D'autres transcrits de 1,6 et 1,7 kb ont également été mis en évidence. Toutefois, il semble que les tests immunologiques actuels ne détectent que les protéines issues du transcrit principal de 2,2 kb, les autres générant des protéines nettement moins abondantes (de l'ordre du picogramme au nanogramme). Un transcrit plus court de 1,35 kb a été mis en évidence dans des tumeurs embryonnaires humaines, mais celui-ci produit une forme tronquée de 37 kDa, à laquelle il manque le premier domaine et un tiers du second. Cette forme tronquée demeure à l'intérieur de la cellule et ne peut être sécrétée, car elle ne peut être glycosylée. Elle est capable d'hétérodimérisation et pourrait se comporter comme un récepteur aux stéroïdes.

Activités biologiques et concentrations physiologiques de l'alpha-fœtoprotéine

L'AFP est présente physiologiquement dans le sérum fœtal. Elle joue en effet un rôle important pendant la vie embryonnaire, où elle exerce différentes activités physiologiques, notamment celles de transporteur et de facteur de croissance cellulaire. De manière similaire à l'albumine, l'AFP peut lier et transporter une multitude de ligands, tels que les ions, la bilirubine, les acides gras polyinsaturés, les rétinoloïdes, les stéroïdes, les flavonoïdes, les phyto-estrogènes, les pigments, les métaux lourds et divers médicaments. À côté de ces fonctions de transporteur, l'AFP possède de nombreuses autres activités biologiques : propriétés chimiotactiques, élimination des radicaux libres, activité estérase, adhérence des leucocytes, etc.

Pendant la vie fœtale, l'AFP est d'abord synthétisée par la vésicule vitelline, puis par le foie et, à un moindre degré, par la muqueuse gastro-intestinale. L'AFP est détectable dans la circulation fœtale dès 30 jours après la conception. Sa concentration sérique atteint 3 à 4 g/L vers la 13^e semaine de gestation. Au même moment, le taux sérique maternel est d'environ 200 µg/L car l'AFP traverse la barrière placentaire (cf. ci-après). Par la suite, les taux d'AFP décroissent jusqu'à l'accouchement. Toutefois, chez le nouveau-né, l'AFP sérique demeure détectable tout en diminuant pendant les six mois qui suivent la naissance (Tableau 1).

La demi-vie de l'AFP est de quatre à six jours. Cela explique la forte diminution des taux sériques d'AFP après la naissance. De même, cette demi-vie courte doit être prise en compte pour l'interprétation des cinétiques du taux d'AFP au cours d'un traitement.

L'unité de résultat par défaut est le µg/L. Lorsque l'unité de résultat alternative, l'UI/mL, est utilisée, il convient d'employer le facteur de conversion propre à chaque technique et mentionné sur la notice (0,826 pour Beckman-Coulter, 0,83 pour Abbott et Siemens, 0,96 pour Ortho...).

Tableau 1 Valeurs de référence de l'AFP dans le sang en fonction de l'âge (µg/L).

Limite	Prématuré	Nouveau-né	2 semaines	1	2	3	4	5	6	7	8	Adulte
				mois								
Inférieure	95 000	13 000	500	20	20	10	10	10	0	0	0	0
Supérieure	175 000	85 000	60 000	10 000	600	200	150	75	30	20	15	12

Valeurs communiquées à titre indicatif. Se référer impérativement aux indications fournies par le fabricant du réactif ou établir les valeurs de référence propres au laboratoire.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'âge influence considérablement les taux d'AFP, en particulier pendant la première année de vie. La limite supérieure de la normale chez l'adulte est en général comprise entre 10 et 20 µg/L, selon les trousse de réactifs utilisées (Tableau 1).

Variations des taux d'alpha-fœtoprotéine

Aucune variation nycthémérale du taux de l'AFP n'a été décrite à ce jour. De même, l'alimentation ou le jeûne ne semblent pas influencer les taux circulants d'AFP.

Variations au cours de la grossesse normale

Comme mentionné ci-dessus, l'AFP est présente normalement dans le sérum fœtal. Le pic de production se situe entre la 12^e et la 14^e semaine de grossesse. L'AFP peut traverser la barrière placentaire : les taux maternels commencent à augmenter à partir de la 12^e semaine de grossesse et atteignent leur valeur maximale à la 30^e semaine de grossesse, au-delà de laquelle ils vont diminuer (Tableau 2). Les taux maternels d'AFP dépendent de différents paramètres, physiologiques et/ou pathologiques, notamment :

- le poids de la parturiente ;
- le nombre de fœtus (cas de grossesses gémellaires) ;
- la présence d'un diabète ;
- des pathologies et/ou malformations fœtales (troubles rénaux, omphalocèle, laparoschisis).

Les taux d'AFP seront plus élevés chez le prématuré que chez le nouveau-né à terme. Après l'accouchement, la baisse du taux est rapide, autant chez la mère que chez l'enfant, compte tenu de sa courte demi-vie (quatre à six jours). Ainsi, les taux atteignent les valeurs de l'adulte chez l'enfant après six à huit mois (Tableau 1).

Variations pathologiques

Après la naissance, toute prolifération et/ou régénération de cellules et de tissus, dont l'origine embryonnaire est la même que celle des organes sécrétant l'AFP chez le fœtus, peut entraîner une augmentation du taux sérique d'AFP. Ainsi, l'AFP peut augmenter en cas de pathologie hépatique, qu'elle soit bénigne ou maligne, ou en cas de tumeurs d'origine germinale (gonades, tératomes).

Pathologies bénignes. Toute régénération du tissu hépatique entraîne une augmentation du taux d'AFP :

- hépatites virales aiguës (30 à 50 % des cas) ;
- hépatites chroniques et cirrhoses (10 à 30 %), où se pose la question de la transformation en CHC (un seuil de 200 ou

400 µg/L est considéré comme évocateur d'une transformation maligne) ;

- pathologies hépatiques inflammatoires ;
- suites d'une hépatectomie ou d'une transplantation de foie partagé.

Pathologies cancéreuses. Divers cancers sont responsables d'élévations parfois très importantes des taux d'AFP, notamment les hépatocarcinomes et les tumeurs gonadiques (surtout testiculaires).

Tumeurs hépatiques. L'AFP augmente dans 70 à 95 % des cas de CHC. Toutefois, l'intérêt diagnostique de l'AFP est variable selon la taille de la tumeur : dans les petites tumeurs, la production d'AFP est limitée, tandis que les tumeurs de taille importante sécrètent des taux très élevés d'AFP.

L'AFP est également utilisée pour le suivi post-chirurgical du CHC. Le seuil de récurrence clinique est en général fixé à 100 µg/L et l'élévation du taux d'AFP est proportionnelle à la taille des nodules récurrents. La réascension du taux d'AFP peut également traduire l'apparition de métastases à distance (principalement pulmonaires et abdominales). Il est également important de noter que, après chirurgie, la réascension du taux d'AFP peut simplement résulter de la régénération hépatique.

Dans les hépatoblastomes et les CHC de l'enfant, on note fréquemment une augmentation des taux d'AFP (80 % des cas), atteignant parfois des valeurs considérables. Toutefois, les taux d'AFP ne sont corrélés, ni avec la taille, ni avec le degré de différenciation de la tumeur. Dans le cas des tumeurs de l'enfant, le seuil de récurrence est situé autour de 1000 µg/L. L'augmentation du taux d'AFP après exérèse prédit le développement de métastases pulmonaires.

L'hétérogénéité des formes d'AFP selon leur degré de fucosylation pourrait permettre de différencier l'AFP du CHC, de l'AFP des maladies bénignes. Ainsi, la structure de la chaîne glycanique de l'AFP produite par un CHC diffère de celle produite par un foie cirrhotique. Ce changement structural, associé à une élévation modérée de la concentration sérique de l'AFP, est souvent évocateur de CHC et précède de plusieurs mois le diagnostic clinique. Certaines études retiennent un seuil de 17 % d'AFP fucosylée comme étant évocateur du CHC [6].

Tumeurs testiculaires. L'AFP augmente dans environ 70 à 100 % des tumeurs germinales non séminomateuses des testicules. Dans ces tumeurs, la présence d'hCG est pratiquement constante, avec des taux parfois considérables. Le dosage de l'AFP, associé à celui de la chaîne β libre de l'hCG, permet donc à la fois le diagnostic et le suivi thérapeutique de ces tumeurs. Ces marqueurs ne représentent cependant

Tableau 2 Valeurs de référence de l'alpha fœtoprotéine (AFP) dans le sang maternel en fonction de l'âge gestationnel (µg/L).

Semaine	13	14	15	16	17	18	19	20	22	24	26	28
Minimum	3	10	15	19	23	28	35	42	50	58	72	75
Médiane	16	24	32	39	46	52	59	68	80	100	120	150
Maximum	40	60	80	97	115	130	147	170	200	250	300	375

Valeurs communiquées à titre indicatif. Se référer impérativement aux indications fournies par le fabricant du réactif ou établir les valeurs de référence propres au laboratoire.

pas un facteur pronostic de l'évolution de la tumeur. Ils sont toutefois utilisés dans le suivi post-thérapeutique et éventuellement post-chirurgical.

Les séminomes testiculaires n'entraînent pas d'augmentation de l'AFP.

Autres pathologies. Une élévation variable des taux d'AFP est également mise en évidence dans différents cancers : tératocarcinomes ovariens, cancers du tube digestif (tumeurs gastriques, pancréatiques, coliques) avec ou sans métastases hépatiques, carcinomes bronchiques. On retrouve également des élévations du taux d'AFP dans certaines pathologies héréditaires, comme l'ataxie-télangiectasie ou la tyrosinémie héréditaire.

Pathologies au cours de la grossesse. L'augmentation des taux d'AFP dans le sang maternel au cours du deuxième trimestre de la grossesse a été utilisée depuis les années 1980 pour dépister les anencéphalies et les anomalies de fermeture du tube neural. Le dosage d'AFP au deuxième trimestre permet de dépister 80 % des spina-bifida et 90 % des anencéphalies. Les taux retrouvés dans ce contexte sont au moins égaux à 2,5 fois la médiane du taux correspondant à l'âge gestationnel au moment du prélèvement. Il en est de même dans 50 % des cas d'omphalocèle et de laparoschisis. Par ailleurs, le dosage d'AFP est réalisable directement sur le liquide amniotique pour le dépistage des dysraphies spinales, mais ses performances sont très inférieures à celles de l'étude qualitative des cholinestérases. Des valeurs de référence pour l'AFP dans le liquide amniotique sont proposées dans le [Tableau 3](#).

De plus, depuis 1997 en France, on utilise le dosage des taux d'AFP combinés avec ceux de l'hCG ou de sa sous unité β libre et/ou de l'oestriol non conjugué, dans le sang maternel, pour le dépistage de la trisomie 21 fœtale au cours du deuxième trimestre de grossesse. En effet, lorsque le fœtus est atteint de trisomie 21, le taux d'AFP sérique maternel tend à être inférieur à la valeur moyenne. Il convient de s'assurer que le kit de dosage et le logiciel de calcul de risque ont bien été validés pour cette indication particulière.

Enfin, certaines malformations fœtales in utero induisent des taux élevés d'AFP à la naissance, qui demeurent élevés par la suite.

Formes moléculaires proches de l'analyte éventuellement présentes

Transcrits alternatifs

Le gène de l'AFP génère divers transcrits, dont la taille varie de 1,35 à 2,2 kb. Ces différents ARNm produisent des protéines de masses moléculaires allant de 37 kDa à 72 kDa,

selon le transcrit considéré [5]. Les formes plus petites sont tronquées au niveau de leur extrémité N-terminale, cette troncature éliminant le domaine 1 et une portion variable du domaine 2 (cette délétion pouvant aller jusqu'au tiers). Ainsi, le transcrit le plus court, de 1,35 kb, produit une forme tronquée de 37 kDa, à laquelle il manque le premier domaine et un tiers du second. Cette protéine tronquée demeure à l'intérieur de la cellule et ne peut être sécrétée. En effet, la délétion partielle du domaine 2 empêche la glycosylation, laquelle semble indispensable à sa sécrétion. Cette protéine tronquée est capable d'hétérodimérisation avec d'autres protéines intracellulaires, notamment les récepteurs aux stéroïdes. Comme décrit ci-après, les épitopes reconnus par les anticorps utilisés, répartis sur les domaines 1 et 2 ou 3, permettent de détecter les formes *full length* de l'AFP (69 à 72 kDa). Les formes tronquées décrites précédemment ne pourront pas être reconnues par les immuno-dosages.

Fragments

L'albumine et l'AFP présentent des homologies de séquence avec des fragments de clivage de la neurotensine et de la neuromédine. Elles pourraient donc constituer des pré-curseurs pour la génération de tels peptides. Il convient de remarquer que des taux élevés de neurokinines accompagnent la pré-éclampsie au cours du dernier trimestre de grossesse. Or, une association entre pré-éclampsie et élévation des taux d'AFP a été rapportée depuis longtemps.

La protéolyse modérée de l'AFP produit des fragments de 32 et 38 kDa, qui génèrent eux-mêmes des fragments résistants à la protéolyse de 23 et 26 kDa. Ces deux fragments possèdent les caractéristiques structurales et antigéniques des domaines 1 et 3 de l'AFP. Ils possèdent des propriétés pro-apoptotiques et de cytotoxicité tumorale [5].

Oligomérisation de l'alpha-fœtoprotéine

L'AFP peut subir des processus d'auto-agrégation et former des dimères, trimères et oligomères in vitro. Ce processus semble également possible in vivo, puisque des trimères ont pu être mis en évidence dans des échantillons humains. La forme dimérique de l'AFP pourrait lui conférer des propriétés de facteur de croissance induite par les estrogènes.

Liaison à des partenaires protéiques

L'AFP peut se lier à différentes protéines, parmi lesquelles les immunoglobulines IgG et IgM, l'actine, le TGF- β , l'ostéonectine ainsi que divers substrats et inhibiteurs de protéases [7]. Ces formes liées de l'AFP peuvent être mises

Tableau 3 Valeurs de référence de l'alpha fœtoprotéine (AFP) dans le liquide amniotique en fonction de l'âge gestationnel ($\mu\text{g/mL}$).

Semaine de grossesse	Médianes régressées	Multiples des médianes régressées		
		2,0	2,5	3,0
15	18,7	37,5	46,8	56,2
16	15,7	31,3	39,1	47,0
17	13,1	26,1	32,7	39,2
18	10,9	21,8	27,3	32,8
19	9,1	18,2	22,8	27,4
20	7,6	15,2	19,0	22,9
21	6,4	12,7	15,9	19,1

Valeurs communiquées à titre indicatif. Se référer impérativement aux indications fournies par le fabricant du réactif ou établir les valeurs de référence propres au laboratoire.

en évidence, soit directement par les techniques immunologiques, soit par l'emploi de méthodes de séparation physique, utilisant le KCl 0,4 M ou des agents chimiques plus agressifs comme l'urée ou la guanidine-HCl.

L'AFP peut également se lier, sous forme monomérique ou multimérique, à divers récepteurs à la surface de la cellule. Au moins quatre récepteurs ont ainsi pu être mis en évidence, qu'ils soient présents dans l'endothélium ou à la surface des cellules épithéliales [5]. Les trois premiers récepteurs, de 18, 31 et 60 kDa, respectivement, sont situés au niveau de l'endothélium de différents organes (cœur, poumon...). Un dernier récepteur, de 62 à 67 kDa, a été mis en évidence au niveau de cellules tumorales mammaires, puis dans des préparations de membranes de monocytes.

Données immuno-analytiques utiles pour le dosage de l'alpha-fœtoprotéine

Phase pré-analytique

Les dosages d'AFP sont possibles sur le sérum, le liquide amniotique et parfois sur divers liquides de ponction. Concernant le dosage d'AFP dans le liquide amniotique, il est recommandé de s'assurer que le kit utilisé est bien validé pour les dosages sur ce milieu biologique particulier.

Le dosage d'AFP peut également être réalisé sur divers liquides de ponction (ascite, liquide pleural...), pour préciser leur origine néoplasique (présence de métastases). Aucune technique n'étant validée pour ce type de milieux biologiques, la plus grande prudence est de mise dans l'interprétation des résultats. Un test d'ajout (méthode des ajouts dosés) peut être réalisé pour s'assurer que la matrice du milieu ne perturbe pas la liaison antigène-anticorps.

Conditions de prélèvement

La programmation et la périodicité du prélèvement sont fonction de la pathologie, de la thérapeutique et de l'objectif du dosage (suivi, réponse au traitement, pronostic...). Différents renseignements devront être mentionnés sur la prescription, notamment la pathologie, les modalités et la date du traitement éventuel.

Comme aucune variation nyctémérale du taux d'AFP n'a été décrite, l'heure de prélèvement importe peu. De même,

le jeûne ne semble pas indispensable pour ce dosage (on évitera tout de même de prélever le malade après un repas, afin d'éviter de recueillir un sérum fortement lactescent).

Prélèvement

Le sang veineux est recueilli par ponction au pli du coude sur un tube sec, sans anticoagulant ni additif. Il est recommandé de prélever un volume de sang suffisamment important, pour effectuer l'analyse et conserver une quantité aliquotée dans la sérothèque. Le prélèvement doit être réalisé en condition d'asepsie et de manière à éviter l'hémolyse. Certaines techniques recommandent l'utilisation de tubes secs avec gels séparateurs. Par ailleurs, certaines trousses de dosage acceptent l'héparine (héparinate de lithium ou de sodium) ou l'EDTA, voire le citrate de sodium comme anticoagulants. Dans tous les cas, il convient de suivre les recommandations figurant sur la notice du kit. Lors du suivi d'un même patient ou de l'étude d'une série de prélèvements, il est recommandé d'utiliser toujours le même type de prélèvement. De même, il convient de s'assurer, auprès du fournisseur de matériel de prélèvement, que les dispositifs utilisés sont compatibles avec la trousse de dosage employée.

Conditions de transport et de centrifugation

Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant une durée inférieure à huit heures. Au-delà, il est impératif de les placer en milieu réfrigéré. Si le transport doit être différé, les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant les 24 heures qui suivent le prélèvement.

Le sérum doit être séparé du caillot et des hématies dans les 24 heures suivant le prélèvement. Il est toutefois nécessaire de laisser reposer l'échantillon avant centrifugation, de manière à ce que le caillot puisse se former et se rétracter. On sera particulièrement attentif aux prélèvements provenant de patients sous traitement anticoagulant ou antithrombotique, dont les temps de coagulation peuvent être allongés. Si l'échantillon est centrifugé avant rétraction complète du caillot, la présence résiduelle de fibrine peut conduire à des résultats erronés.

Les conditions de centrifugation des échantillons doivent être déterminées à partir des informations fournies par le fabricant des matériels de prélèvement pour ce type de dosage.

Les échantillons peuvent être conservés pendant quatre à sept jours entre 2 et 8 °C et pendant deux ans à -20 °C. Cependant, les congélations et décongélations successives sont fortement déconseillées. Après décongélation, les échantillons doivent être homogénéisés avec soin au Vortex. Les échantillons décongelés contenant des globules rouges ou des particules en suspension ainsi que les échantillons d'apparence trouble doivent être centrifugés avant utilisation.

Interférences visibles

Selon la technique de dosage, l'hémolyse ou la lipémie peuvent interférer sur le résultat. De ce fait, il est grandement recommandé de rejeter tout prélèvement fortement hémolysé et/ou fortement lactescent, et de demander un nouveau prélèvement. De même, tout prélèvement contenant des hématies et/ou des particules de fibrine en suspension doit être de nouveau centrifugé et décanté.

Cas particulier du dosage de l'alpha-fœtoprotéine chez la femme enceinte

L'âge gestationnel doit être déterminé avec précision pour interpréter les résultats des dosages prénataux d'AFP. Ce renseignement doit obligatoirement être indiqué sur la fiche de renseignements cliniques jointe à l'échantillon. En cas d'âge du fœtus incertain, une évaluation échographique doit être pratiquée. Ce renseignement est en effet indispensable pour déterminer les valeurs de référence des dosages d'AFP dans le sang maternel (Tableau 2) et dans le liquide amniotique (Tableau 3). De même, les logiciels d'estimation du risque d'aneuploïdie basent leurs calculs sur l'âge gestationnel.

Les mesures de l'AFP dans le sang maternel ne peuvent pas être valides après l'amniocentèse, en raison d'une libération d'AFP fœtal dans la circulation maternelle. De ce fait, les échantillons de sang maternel devront être prélevés avant la réalisation de l'amniocentèse. Dans le cas contraire, il est recommandé d'attendre au moins deux semaines après l'amniocentèse pour réaliser le dosage d'AFP sanguin chez la mère.

Le liquide amniotique est prélevé de manière aseptique par un praticien expérimenté, sous contrôle échographique. Toutes les mesures destinées à garantir la sécurité de la mère et du fœtus seront prises pendant la procédure. Il est de plus nécessaire de rechercher la présence de cellules sanguines fœtales dans le prélèvement, par la technique de Kleihauer-Betke, et/ou d'hémoglobine fœtale, par électrophorèse ou par une autre technique appropriée, au cas où l'échantillon serait visiblement contaminé par du sang. En effet, les échantillons de liquide amniotique contaminés par du sang fœtal présentent des concentrations anormalement élevées en AFP, ce qui peut conduire à une interprétation erronée du dosage.

Données spécifiques concernant l'immuno-dosage

Épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux

Le développement d'anticorps monoclonaux a permis la détection et la catégorisation de différents épitopes au sein de l'AFP native. Ces études ont permis de mettre en évidence six à sept épitopes majeurs au niveau de cette

protéine, ainsi que sept épitopes mineurs additionnels [5]. Les six épitopes majeurs ont été dénommés A, B, C, D, E et X et correspondent à des sites de liaisons de haute affinité aux anticorps (Fig. 2C). Le dernier épitope appelé X correspond à un site antigénique partiellement masqué. Cette carte épitopique a été confirmée par les travaux d'autres équipes, qui ont identifié 11 sites antigéniques sur la molécule d'AFP, parmi lesquels figurent les épitopes majeurs (A à E) précédemment décrits. Ces différentes études ont utilisé plus de 30 anticorps monoclonaux dirigés contre l'AFP humaine. Certains de ces anticorps réagissent différemment avec la molécule, selon qu'elle est en solution ou adsorbée sur des surfaces solides (ces derniers anticorps correspondant à des sites antigéniques cachés ou cryptiques, ne pouvant être exposés que lorsque la protéine est partiellement dénaturée sur une phase solide, comme le plastique ou la nitrocellulose). Enfin, il a été observé que les différents anticorps monoclonaux reconnaissent les principaux épitopes de l'AFP, que celle-ci provienne de sang de cordon, de placenta ou de tissus tumoraux. Seules des différences mineures ont été mises en évidence entre le sang de cordon et le placenta, ce qui suggère qu'il existe des différences au niveau de la conformation de la protéine entre ces différents tissus [5].

Problèmes analytiques éventuels

La plupart des kits commercialisés utilisent comme anticorps de capture un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine 1 de l'AFP. L'anticorps de détection est dirigé contre les domaines 2 ou 3 de la protéine, lesquels sont moins spécifiques que le domaine 1. Ainsi, seules les formes non tronquées de l'AFP, de 69 à 72 kDa, peuvent être détectées par de tels systèmes.

Un effet crochet, donnant des résultats dans les domaines de mesure du kit de dosage pour des concentrations en analyte très élevées, peut se produire en cas de tumeurs fortement sécrétrices. Le seuil de concentration au-delà duquel l'effet crochet est susceptible de se produire est extrêmement variable selon les techniques, allant de 500 ng/mL à plus 2 000 000 ng/mL d'AFP. On se rapportera donc aux données indiquées dans la notice du kit utilisé. En cas de concentration en AFP supérieure au seuil limite, une dilution au 1/10^e s'avère nécessaire.

Les échantillons prélevés sur des patients auxquels ont été administrées des préparations d'anticorps monoclonaux de souris, à des fins diagnostiques ou thérapeutiques, peuvent contenir des anticorps hétérophiles (anticorps humains anti-souris [HAMA]). Ces anticorps sont également retrouvés chez des sujets fréquemment en contact avec des animaux ou des produits contenant du sérum d'animaux. Ces anticorps peuvent réagir avec les immunoglobulines du réactif et interférer avec le dosage. De tels échantillons peuvent ainsi donner des résultats faussement augmentés ou diminués, lorsqu'ils sont analysés avec des kits utilisant des anticorps monoclonaux murins. Certains réactifs renferment un composant réduisant l'effet de HAMA sur la formation du complexe antigène-anticorps.

Les dosages successifs sont effectués avec la même technique et, de préférence, par le même laboratoire. En cas de changement de technique de dosage, l'examen est réalisé avec reprise d'un échantillon précédent, conservé au

moins un an. De même, en cas de variation du résultat du dosage par rapport aux antécédents, inexplicable par la clinique et/ou le traitement, une analyse concomitante de l'échantillon actuel et de celui provenant de la sérothèque s'avère indispensable.

Molécule de référence utilisée pour la calibration

La préparation de référence utilisée pour la calibration du test est la WHO 1st IRP # 72/225, ou Premier Standard OMS 72/225 pour l'AFP (fournie par l'Organisation mondiale de la santé [OMS]). Il s'agit d'un pool de sérums de cordons ombilicaux, correspondant au mélange de centaines d'échantillons. Ce pool a été initialement caractérisé par le *Statens Serum Institut* (SSI) de Copenhague (Danemark), puis utilisé comme premier matériel de référence par l'OMS en 1975 [8]. Cette préparation a fait l'objet de deux études collaboratives, utilisant différentes méthodes analytiques, parmi lesquelles la radioimmunoanalyse, l'immuno-diffusion radiale ou l'immuno-électrophorèse [9,10]. Six laboratoires ont ainsi conclu qu'une unité représente approximativement 1,21 ng d'AFP (1,02 à 1,43 ng) [11]. Cet étalon est distribué depuis le 1^{er} juillet 1997 par le *National Institute for Biological Standards and Controls* (NIBSC), à Potter Bar, au Royaume-Uni. Chaque ampoule de cette préparation contient, par définition, 100 000 UI d'AFP, soit approximativement 70 mg de protéine. La plage de récupération recommandée par rapport à ce Premier Standard OMS pour l'AFP est comprise entre 90 et 110 %.

Codes NABM

Marqueur tumoral : NABM 0320.

Marqueurs de la trisomie 21 : NABM 4000.

Dosage sur liquide amniotique : NABM 4020.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tout particulièrement Mme le Docteur Brigitte Dousset, praticien hospitalier au laboratoire de biochimie spécialisée de l'hôpital central du CHU de Nancy, pour sa relecture attentive du manuscrit.

Références

- [1] Crandall BF. Alpha-fetoprotein: a review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1981;15:127–85.
- [2] Breborowicz J. Microheterogeneity of human alphafetoprotein. *Tumour Biol* 1988;9:3–14.
- [3] Taketa K. Characterization of sugar chain structures of human alpha-fetoprotein by lectin affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 1998;19:2595–602.
- [4] Yang F, Luna VJ, McAnelly RD, Naberhaus KH, Cupples RL, Bowman BH. Evolutionary and structural relationships among the group-specific component, albumin and alpha-fetoprotein. *Nucleic Acids Res* 1985;13:8007–17.
- [5] Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:377–408.
- [6] Denis I, Beaudonnet A, Pichot J, Roubille M, Gelineau M. Focus on a new assay of fucosylated alpha-fetoprotein and evaluation in the biological diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Biol Clin* 2000;58:85–90.
- [7] Mizejewski GJ. alpha-fetoprotein as a biologic response modifier: relevance to domain and subdomain structure. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;215:333–62.
- [8] WHO expert committee on biological standardization: twenty-seventh report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1976;1–86.
- [9] Sizaret R, Breslow N, Anderson SG. Collaborative study of a preparation of human cord serum for its use as a reference in the assay of alphafoetoprotein. *J Biol Stand* 1975;3:201–23.
- [10] Sizaret P, Anderson SG. The International Reference Preparation for alpha-foetoprotein. *J Biol Stand* 1976;4:149.
- [11] Equivalence between international units and mass units of alpha-foetoprotein. Report of a collaborative study. *Clin Chim Acta* 1979;96:59–65.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com


ÉDITORIAL

La fin d'une belle aventure

The end of a great adventure

Ce numéro de la revue *IBS*, l'un des moyens d'expression de l'Acorata, sera le dernier.

Cet éditorial s'adresse à nos fidèles lecteurs pour expliquer les raisons de ce retrait, mais aussi pour marquer les différentes étapes qui ont jalonné la vie d'*IBS* depuis sa création.

Les raisons du retrait sont multiples :

- la lourdeur de la tâche de rédacteur en chef qui décourage les vocations ;
- le nonaccès d'*IBS* à Medline, et ses conséquences sur le recrutement d'articles ;
- le nombre excessif de revues de biologie clinique à l'origine de redondances ;
- la concurrence des organismes de développement professionnel continu (DPC) offrant des sessions de formation validantes ;
- le désintérêt des industriels vis-à-vis de la revue.

La seconde partie illustre le côté valorisant d'une entreprise qui a dû sa réussite à la conjonction d'une décision heureuse et des efforts continus d'une équipe.

IBS vient d'atteindre sa vingt-sixième année (1987–2013). Pour bien suivre son parcours, il faut rappeler que ce titre est la propriété de l'Acorata, association selon la loi de 1901, créée en 1983 par une poignée de biologistes hospitaliers spécialisés en radio-immunologie.

Cette entrée de l'Acorata dans le paysage biologique français coïncidait avec le développement de techniques immunologiques non isotopiques. Ces dernières, à quelques exceptions près, ont supplanté les dosages radio-immunologiques.

Cette évolution était inéluctable car il faut se souvenir qu'en 1983, seuls 120 laboratoires hospitaliers (contre près de 4000 laboratoires d'analyses de biologie médicale) avaient accès aux techniques isotopiques. Dans la mesure où le principe des immunodosages est le même quel que soit le marqueur, il a paru logique de faire partager une

expérience de plus de 20 ans [1,2]¹. Au fil des années, la revue *IBS* a perdu sa marque initiale pour apporter sa contribution à la biologie clinique, à travers des rubriques concernant aussi bien la biologie spécialisée (immuno-analyse, biologie moléculaire, techniques en -omique, etc.) que la biologie de terrain.

Il est pour moi émouvant de parler de la période 1983–1987, qui peut être considérée comme une période pré- et néonatale pendant laquelle l'Acorata a mis en place une publication autogérée, appelée le « *Trait d'Union* ». Je tiens ici à rendre hommage à tous ceux qui lui ont donné de leur temps et de leur énergie créatrice². Toutes les opérations débouchant sur la diffusion en France du *Trait d'Union* ont été réalisées par ce groupe, qu'il s'agisse de la quête des manuscrits, de la relecture des articles, de la recherche de publicité, ou des relations avec l'imprimeur, de la création du « chemin de fer » à la gestion du fichier pour les envois et même à la maîtrise de l'affranchissement postal.

Cette activité, jointe à l'organisation d'un colloque annuel, a contribué à asseoir la notoriété de l'Acorata, ce qui explique l'intérêt, en 1987, d'un responsable des Éditions Elsevier, Alain Devanlay.

Depuis cette date, nos relations professionnelles et humaines avec les Éditions Elsevier Masson ont été de qualité ; il est difficile de citer tous les noms des responsables qui, à des titres divers, ont contribué au renforcement et à l'amélioration de la revue.

Je veux remercier Mathilde Docquin qui a materné le Comité de rédaction pendant de nombreuses années, ainsi que Christine Sempé et Olivier Chabot pour leur collaboration et leurs conseils, de même que David Fournier et Jean-Marie Pinson pour leur gestion de la régie publicitaire...

¹ R.S. Yalow et S.A. Berson, dont je rappelle ici le travail, ont reçu le prix Nobel de médecine en 1977.

² Citons Isabelle Collignon, Christine Ferrière, Yvonne Fulla, Jean Guéris, Marie-Liesse Piketty, Jean-Charles Ruiz, Marie-Hélène Schlager, et Jean-Pierre Yvert (actuel Président de l'Acorata).

Pendant toutes ces années, nous avons suivi Elsevier dans sa quête d'espaces, depuis la rue des Plantes jusqu'à Issy-les-Moulineaux, en passant par la rue de Javel.

Plusieurs rédacteurs en chef se sont succédé : 1987–2003 : Jacques Ingrand, 2004–2009 : Bernard Poggi, 2010–2011 : Marc Bogard, 2012 : Anton Szymanowicz, 2013 : Jacques Ingrand.

Les deux derniers ont connu les affres et les joies procurées par le système EES, *big brother* que je considère maintenant avec objectivité ; je n'oublierai pas de remercier Brigitte Gorsse, responsable de la production éditoriale, pour son efficacité, et Amélie Fruchart (Elsevier France-support) pour sa patience envers les néophytes.

En conclusion — et je reviens sur le titre de cet éditorial — je veux dire qu'au-delà de la déception causée par la disparition d'une revue de qualité, il ne faut retenir que la réussite d'une initiative rendue possible par la coopération d'hommes et de femmes motivés par un même objectif : viser le meilleur.

Déclaration d'intérêts

L'auteur n'a pas transmis de déclaration de conflits d'intérêts.

Références

- [1] Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960;39(7):1157–75.
- [2] Ekins R. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta* 1960;5(4):453–9.

J. Ingrand

Professeur émérite université Paris V,

Président fondateur de l'Acorata

Adresse e-mail : ingrand.jacques@orange.fr

Reçu le 8 octobre 2013 Accepté le 10 octobre 2013



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

La polyarthrite rhumatoïde : apport de la biologie au diagnostic et au suivi thérapeutique

Diagnostic and predictive value of laboratory testing in rheumatoid arthritis

L. Musset*, P. Ghillani-Dalbin

Laboratoire d'immunochimie et auto-immunité, département d'immunologie, groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière/C. Foix, AP-HP, 47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France

Reçu le 27 mai 2013 ; accepté le 30 mai 2013

KEYWORDS

Rheumatoid arthritis;
Rheumatoid factor;
ACPA;
Anti-citrullinated
protein antibody;
Antinuclear
antibodies

MOTS CLÉS

Polyarthrite
rhumatoïde ;
Facteur rhumatoïde ;
ACPA ;
Anticorps
anti-protéines et
peptides citrulinés ;
Anticorps
anti-nucléaires

Summary Rheumatoid arthritis, among the most frequent autoimmune disease, is characterized by a chronic joint inflammation possibly leading to severe damage. Progression of the disease may be very quick, which demands an early diagnostic and administration of active drugs. The authors present the laboratory tests useful for the diagnosis and the therapeutic follow-up of rheumatoid arthritis

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie auto-immune la plus fréquente et se caractérise par une inflammation chronique des articulations pouvant conduire à leur destruction. Les formes sévères se manifestent par une évolution rapide, d'où la nécessité d'un diagnostic précoce et la mise en route le plus tôt possible d'un traitement adapté dans le but d'éviter des complications parfois irréversibles et le handicap. Cet article rapporte les examens de biologie médicale utiles pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la maladie auto-immune la plus fréquente et se caractérise par une inflammation chronique des articulations pouvant conduire

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lucile.musset@psl.aphp.fr (L. Musset).

à leur destruction. L'inflammation de la synoviale entraîne progressivement une déformation articulaire, puis une destruction de l'os et du cartilage. La PR est également une maladie systémique pouvant s'accompagner de manifestations extra-articulaires (cardiaques, pulmonaires, vasculaires, nerveuses, oculaires...) ayant parfois des répercussions sur le pronostic vital. Elle est présente dans tous les pays et toutes les ethnies et touche environ 0,5 % de la population. Sa cause est inconnue, mais il existe un lien avec une prédisposition génétique (HLA DRB1, sexe féminin), et des facteurs environnementaux (toxiques comme le tabac et/ou infectieux). Les formes cliniques de la PR sont multiples. Il existe des formes bénignes et des formes sévères. L'évolution habituelle se fait par poussées inflammatoires plus ou moins intenses, pouvant conduire à une aggravation des lésions, avec atteinte d'autres articulations jusque-là indemnes. Les formes sévères se manifestent par une évolution rapide, d'où la nécessité d'un diagnostic précoce et la mise en route le plus tôt possible d'un traitement adapté dans le but d'éviter des complications parfois irréversibles et le handicap. Pour traiter tôt, il faut diagnostiquer tôt. Les progrès réalisés en imagerie (échographie et IRM), en biologie médicale (auto-anticorps anti-peptides et protéines citrullinés), et en thérapeutique (biothérapies) ont considérablement changé l'approche diagnostique et la prise en charge des patients et finalement le pronostic de la maladie. Dans sa pratique quotidienne, le rhumatologue est confronté à une grande diversité de pathologies, allant du myélome aux pathologies ostéoarticulaires d'étiologies très diverses, et aux maladies auto-immunes. Cet article rapporte les examens de biologie médicale utiles pour le diagnostic, le suivi et la prise en charge thérapeutique de la PR.

Critères de classification de la polyarthrite rhumatoïde

Des critères de classification avaient été définis en 1987 par l'American College of Rheumatology (ACR). Ils reposaient essentiellement sur des arguments cliniques et radiologiques comme :

- raideur matinale articulaire et périarticulaire, durant au moins une heure ;
- arthrite touchant trois groupes articulaires ou plus avec gonflement articulaire (genoux, coudes, poignets, métacarpophalangiennes [MCP]...);
- arthrite touchant les articulations de la main : MCP, poignets, interphalangiennes proximales ;
- arthrites symétriques : atteinte simultanée des mêmes groupes articulaires bilatéralement ;
- présence de nodules rhumatoïdes ;
- nodules sous-cutanés en regard des proéminences osseuses, des surfaces d'extension, ou des régions périarticulaires ;
- modifications radiologiques avec érosions, décalcifications osseuses des mains et des poignets.

Pour la biologie, seul le facteur rhumatoïde (FR) faisait partie de ces critères avec la dénomination suivante : « mise en évidence d'une quantité anormale de FR dans le sérum, par une technique dont le résultat est positif chez moins

Tableau 1 Fréquence des facteurs rhumatoïdes décelables par des techniques d'agglutination.

Situation	Fréquence de détection
<i>Sujet normal (< 65 ans)</i>	< 5 %
<i>Sujet normal âgé (> 65 ans)</i>	5–10 %
<i>Pathologies avec manifestations articulaires</i>	60–80 %
<i>Polyarthrite rhumatoïde</i>	
Syndrome de Sjögren primitif	70–90 %
Lupus érythémateux systémique	25–40 %
Sclérodémie systémique	20–30 %
Hépatite chronique auto-immune	10–45 %
Connectivite mixte	40–50 %
Sarcoïdose	10–25 %
Endocardite bactérienne subaiguë	20–45 %
<i>Pathologies sans manifestations articulaires</i>	
Infections bactériennes	10–20 %
Infections virales (EBV surtout)	20–60 %
Infections parasitaires (Leishmaniose...)	50–80 %
Cirrhose biliaire primitive	50–60 %

D'après Cahier de formation, Bioforma (1999) [2].

de 5 % des sujets normaux». Ces critères de classification devaient évoluer. En effet, les anomalies radiologiques sont parfois retardées de plusieurs mois par rapport aux données cliniques. Quant aux FR dénommes ainsi car ils semblaient caractéristiques de la PR, ils peuvent être décelés dans de nombreuses autres maladies, et manquent à la fois de sensibilité et de spécificité (Tableau 1). Depuis 2010, de nouveaux critères de classification ont été proposés par l'ACR et l'European League Against Rheumatism (EULAR) [1]. Ils introduisent deux critères de biologie distincts : des examens sérologiques (dosages des FR et dosage des anticorps anti-protéines citrullinées), et des marqueurs sériques d'inflammation aiguë (C-réactive protéine [CRP] et vitesse de sédimentation [VS]) (Tableau 2).

De plus, le DAS28 «Disease Activity Score» devient un critère de mesure d'activité de la PR qui tient compte de l'évaluation de la douleur et du nombre de synovites sur 28 sites articulaires proposés par l'EULAR, de la valeur de la VS et de l'appréciation globale du patient sur une échelle visuelle analogique de 100 mm. Il sera utilisé pour suivre l'évolution de la PR sous traitement.

Examens de biologie utiles au diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde

Depuis 2010, comme l'imagerie (échographie et IRM), la biologie a pris une part grandissante dans le diagnostic de la PR. Ces examens de biologie comprennent, d'une part, des tests de biologie générale et, d'autre part, des tests de biologie spécialisée utiles au diagnostic positif de la maladie mais également au diagnostic différentiel avec d'autres maladies auto-immunes, notamment le lupus érythémateux systémique, ou d'autres maladies infectieuses (arthrites virales, bactériennes...).

Tableau 2 Polyarthrite rhumatoïde : critères de classification de l'ACR/EULAR 2010 [1]. Algorithme basé sur un score obtenu en additionnant les critères de A à D. Un score total supérieur ou égal à 6/10 est nécessaire pour classer un patient comme ayant une PR définie.

Critères	Scores
Population cible : patients ayant au moins une articulation avec synovite non expliquée par une autre maladie	
A. Atteinte articulaire	
1 grosse articulation	0
2 – 10 grosses articulations	1
1 – 3 petites articulations	2
4 – 10 petites articulations	3
Plus de 10 articulations (avec au moins une petite articulation)	5
B. Sérologie (au moins une mesure est requise pour la classification)	
FR et APPC négatifs	0
FR ou anti-ACPA faiblement positifs (< 3 N)	2
FR ou anti-ACPA fortement positifs (> 3 N)	3
C. Marqueur d'inflammation aiguë (au moins une mesure est requise pour la classification)	
CRP et VS normales	0
CRP ou VS anormale	1
D. Durée des symptômes	
< 6 semaines	0
≥ 6 semaines	1

ACR : American College of Rheumatology; ACPA : *anti-citrullinated protein antibody*; APPC : anti-peptides ou protéines citrulinés; CRP : C-réactive protéine; EULAR : European League Against Rheumatism; FR : facteur rhumatoïde; VS : vitesse de sédimentation; PR : polyarthrite rhumatoïde.

Examens de biologie générale

S'agissant d'une maladie inflammatoire chronique, un bilan sanguin simple à la recherche de marqueurs de l'inflammation est nécessaire. Ce sont au minimum un hémogramme (à la recherche d'une anémie souvent discrète), la VS à la première heure, et un dosage de CRP sérique. Éventuellement, lorsque l'électrophorèse des protéines sériques a été réalisée, on note une augmentation des alpha2-globulines en lien avec l'augmentation des protéines de l'inflammation.

Examens de biologie spécialisée

Aux facteurs rhumatoïdes se sont ajoutés les anticorps anti-protéines et peptides citrulinés ainsi que d'autres anticorps.

Facteurs rhumatoïdes et techniques de détection

Les facteurs rhumatoïdes (FR) sont des auto-anticorps, principalement d'isotype IgM (parfois d'isotype IgG ou IgA), dirigés contre le fragment Fc (la partie constante) d'IgG humaines et/ou animales. Leur détection est historiquement réalisée par deux techniques : agglutination

de particules de latex recouvertes d'IgG humaines (appelée test au latex) et hémagglutination passive utilisant des IgG de lapin fixées à la surface de globules rouges de mouton (appelée test de Waaler-Rose). Selon les critères de l'ACR/EULAR de 2010, la recherche de FR doit être quantitative de sorte que les tests semi-quantitatifs (agglutination sur lame ou immunodot) ne sont plus adaptés et sont à proscrire. Les techniques aujourd'hui préconisées sont des techniques néphélométriques, turbidimétriques, ou immunoenzymatiques (de type Elisa), voire des techniques multiplex. Ainsi, pour la prescription, les termes de « latex » et de « Waaler-Rose » sont devenus obsolètes et doivent être remplacés par le terme générique : « recherche de facteurs rhumatoïdes ». Les résultats sont exprimés en UI/mL à partir d'un étalonnage basé sur le standard de l'OMS. Le seuil de positivité varie en fonction de la technique utilisée. La présence de FR à des taux élevés (supérieur à trois fois la valeur seuil de positivité du test utilisé) a une plus grande valeur diagnostique pour la PR. Les FR d'isotype IgG ou IgA sont exceptionnellement prescrits, ils sont réalisables par technique Elisa ou multiplex.

L'interprétation des résultats de la recherche de FR doit être replacée dans le contexte clinique ayant justifié sa recherche. En effet, ces IgM à activité anti-IgG ont été appelées FR car elles semblaient autrefois caractéristiques de la PR. Cette notion est fautive. Les FR peuvent être décelés dans de nombreuses autres maladies avec une fréquence variable selon la technique utilisée et les cohortes étudiées (Tableau 1) [2]. La sensibilité du test varie également en fonction du stade de la maladie, et cette sensibilité est faible au stade précoce. Cependant, même si les FR ne sont pas spécifiques de la PR, leur recherche et quantification restent utiles pour la prise en charge d'un rhumatisme inflammatoire [1,3].

Auto-anticorps anti-peptides ou protéines citrulinés

Ces auto-anticorps ont reçu successivement plusieurs appellations : anti-périnucléaires (1964), anti-kératine (1979), anti-stratum corneum, anti-filaggrine (1993), anti-peptides cycliques citrulinés (anti-CCP), ou anti-peptides ou protéines citrulinés (APPC) (2000) [4,5]. Ces anticorps ont comme cible commune des épitopes citrulinés générés par la modification post-traductionnelle de différentes protéines, fréquente au cours de l'inflammation. Cette modification est nommée déimination ou citrullination et se fait grâce à une enzyme, la peptidylarginine déiminase, au sein de la membrane synoviale [6].

Techniques de détection. Tous ces anticorps reconnaissent des épitopes peptidiques centrés sur un résidu citrullyl d'où l'idée de produire un peptide de synthèse (dérivé de la filaggrine humaine) qui soit citrulliné et cyclisé. Ce concept a été breveté et commercialisé pour la fabrication des tests de détection des anticorps appelés anti-CCP. Cette production industrielle aurait pu permettre une standardisation des techniques de détection de ces anticorps. Il n'en est rien. En effet, la (pro)-filaggrine et ses variants sont absents du tissu synovial rhumatoïde et un nombre important de PR sont dites « séronégatives » vis-à-vis de ces anticorps avec ces tests dits de première génération. Ces observations ont conduit scientifiques et industriels à rechercher la présence d'anticorps contre d'autres protéines citrulinées

présentes dans le tissu synovial rhumatoïde. Les dépôts de fibrine, porteurs d'épitopes citrullinés sont une des caractéristiques du tissu synovial rhumatoïde et sont la cible des anticorps produits localement par les plasmocytes infiltrant ce tissu et participant au maintien de l'inflammation [6]. La vimentine citrullinée est également présente dans la synoviale des patients atteints de PR. C'est un constituant des filaments intermédiaires du cytosquelette, exprimé dans de nombreuses cellules dont les chondrocytes. D'autres sources antigéniques ont été développées pour détecter les anticorps anti-protéines citrullinées : filaggrine de rat recombinante citrullinée, fibrinogène citrulliné, vimentine citrullinée *mutated citrullinated vimentin* et collagène humain de type 1 citrulliné [7,8]. Les tests commercialisés aujourd'hui permettent de rechercher des anticorps anti-protéines et/ou peptides citrullinés. La composition exacte des réactifs n'est pas connue, mais le terme d'anti-CCP est trop restrictif et devrait être remplacé par anti-protéines citrullinées ou ACPA pour *anti-citrullinated protein antibody* tel que recommandé par l'ACR en 2010 [1].

Les ACPA sont recherchés par des techniques immunoenzymatiques de type Elisa qui permettent leur quantification. En l'absence de standardisation, les unités sont des unités arbitraires qui varient selon le réactif utilisé, mais ces chiffres permettent de différencier les patients avec un taux faible et ceux avec un taux élevé (supérieur à trois fois la valeur seuil de positivité du test utilisé). Les tests d'immunofluorescence indirecte sur cellules de muqueuse buccale (anticorps anti-périnucléaires) ou coupes d'œsophage de rat (anticorps anti-*stratum corneum* ou filaggrine) ne sont pratiquement plus utilisés car ils sont peu reproductibles et semi-quantitatifs.

Autres auto-anticorps décrits dans la polyarthrite rhumatoïde

D'autres auto-anticorps associés à la PR ont été décrits : auto-anticorps anti-alpha-énolase [9], anti-calpastatine [10], anti-glucose-6-phosphate isomérase (GPI), anti-RA 33, anti-*major microtubule organizing center* (MTOC), anti-peptidyl arginine déiminase (PAD). Cependant, leurs performances diagnostiques (sensibilité, spécificité) sont moins bonnes que celles des ACPA, et ils ne sont pas recherchés en pratique courante. Récemment, l'analyse protéomique de liquides synoviaux de patients atteints de PR a défini un inventaire de protéines citrullinées dans l'articulation, dénommé « citrullinome » [11]. Parmi ces protéines, l'apolipoprotéine E, le *myeloid nuclear differentiation antigen* (MND) et la β -actine sont montrés comme des cibles du système immunitaire dans la PR. Pour chaque protéine, il existe des épitopes citrullinés immunodominants et des tests multiplex utilisant des peptides immunodominants issus de ces trois protéines seraient plus prédictifs de PR que l'utilisation des peptides individuellement.

D'autres auto-anticorps, distincts des ACPA et dirigés contre des protéines modifiées par carbamylation (modification post-traductionnelle de résidus lysine en homocitrulline) ont été rapportés [12]. Ces anticorps anti-protéines carbamylées (anti-CarP) ont été mis en évidence chez 45 % des patients avec PR. Dans cette étude, parmi les patients avec PR mais sans ACPA, 30 % avaient des anticorps anti-CarP d'isotype IgA et 16 % d'isotype IgG (35 % avaient

Tableau 3 Sensibilité et spécificité des anticorps anti-CCP, en fonction du stade de la maladie ([1,15]7).

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Phase initiale « pré-polyarthrite rhumatoïde »	34	98
Phase d'état – de 6 mois	58	94
Phase d'état + de 12 mois	88	93

Anti-CCP : anti-peptides cycliques citrullinés.

l'un ou l'autre isotype). Ainsi, la recherche de ces anticorps pourrait avoir un intérêt chez les patients séronégatifs (sans anticorps anti-protéines citrullinées) mais cette notion doit être renforcée par des études complémentaires.

Autres anticorps utiles au diagnostic différentiel

Les anticorps anti-nucléaires (AAN), sont des auto-anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques du noyau mais aussi du cytoplasme des cellules de l'organisme. Ces anticorps sont successivement recherchés par une technique de dépistage (par immunofluorescence indirecte sur cellules humaines de type HEp-2), puis identifiés à l'aide de tests spécifiques. Le dépistage renseigne sur le titre des anticorps et leur aspect de fluorescence. En cas de positivité ($> 1/80^e$), et quel que soit l'aspect, l'identification est réalisée par des tests spécifiques (Elisa, multiplex, immunodots...), toutes ces techniques ayant pour but d'identifier la ou les cibles antigéniques reconnues par ces AAN. Ces anticorps peuvent être quantifiés, selon la technique utilisée, mais en l'absence de standardisation, les résultats sont exprimés en unités arbitraires (UA). Les AAN sont principalement recherchés au cours de maladies auto-immunes non spécifiques d'organes. Ils sont positifs dans 40 à 50 % des cas de PR. Il n'existe pas des AAN spécifiques de la PR et la présence des AAN ne constitue pas un critère diagnostique de PR. Néanmoins, leur mise en évidence chez un patient porteur d'une polyarthrite encore inclassée peut orienter vers un diagnostic de maladie auto-immune, donc de PR. Dans ce cas, la recherche d'anticorps anti-ADN natif est en général négative.

Valeur diagnostique des anti-protéines citrullinées et interprétation des résultats

La valeur diagnostique des ACPA varie en fonction de leur taux, du stade et/ou de la durée d'évolution de la maladie, des populations témoins étudiées, du seuil de positivité choisi et des méthodes de détection utilisées (Tableau 3) [8,13–16]. Néanmoins, la caractéristique commune de ces tests est leur grande spécificité diagnostique, allant de 93 à 98 %. En dehors de la PR, ils peuvent être détectés chez des patients atteints de lupus (13 %), de syndrome de Gougerot-Sjögren (3–8 %), de sclérodémie systémique (10–15 %), d'hépatite auto-immune de type I (9 %) ou d'hépatites chroniques (25 %) [14,17]. De nombreux travaux ont montré que leur présence chez des patients atteints d'un rhumatisme inflammatoire débutant, encore non classé, est un marqueur prédictif du développement d'une PR surtout lorsque le titre est élevé. C'est dans ce contexte clinique qu'ils doivent être

prescrits. Il a été montré que ces anticorps apparaissent très précocement, voire même précèdent de plusieurs années le début de la maladie [6–8,13].

Les ACPA apparaissent plus précocement que les FR lors d'une PR [16,17]. Deux tiers des sérums de PR sans FR contiennent des ACPA. La valeur prédictive positive des deux anticorps associés est estimée en moyenne entre 91 et 100%. La présence simultanée de FR et d'ACPA est particulièrement prédictive d'une progression rapide de la PR et de l'apparition d'érosions. Aussi, il est recommandé de rechercher en parallèle les FR et les ACPA, selon les recommandations internationales [1,3]. En effet, ces deux familles d'anticorps ne sont pas recouvrantes. Ils sont une aide pour le clinicien et orientent la prise en charge thérapeutique.

En pédiatrie, les ACPA sont également utiles car ils sont présents dans les formes polyarticulaires d'arthrite juvénile idiopathique souvent associées aux FR.

Quant à leur valeur pronostique, les ACPA sont associés le plus souvent aux formes sévères et actives de la PR. Leur présence chez des patients ayant une PR récemment découverte est un marqueur prédictif du développement d'une PR érosive. Ils sont corrélés à certains paramètres de sévérité (force de prise, raideur matinale des articulations, index fonctionnel, érosions articulaires, déformations des mains, présence de nodules sous-cutanés) et aux paramètres de l'inflammation (VS, CRP).

Examens de biologie utiles lors du suivi thérapeutique

Le traitement de la PR repose sur deux lignes thérapeutiques : les anti-inflammatoires qui visent à maîtriser les manifestations inflammatoires articulaires (traitement suspensif) et les traitements de fond dont le but est d'obtenir une rémission (ou à défaut un contrôle de l'activité de la maladie), de prévenir les lésions structurales et le handicap fonctionnel, de limiter les conséquences psychosociales et d'améliorer ou de préserver la qualité de vie du patient [1,3,18]. Les modalités thérapeutiques diffèrent en fonction du stade évolutif de la maladie (stade initial ou stade d'état). En première intention, en l'absence de contre-indication (néphropathie, hépatopathie, leucopénie, désir de grossesse, infection...), il est recommandé de débiter le traitement de fond par le méthotrexate. D'autres traitements de fond peuvent être proposés en alternative : le léflunomide ou la sulfasalazine. L'existence initiale de signes de sévérité (lésions structurales par exemple) peut faire envisager en première intention un traitement plus intensif : soit une biothérapie par anti-TNF α de préférence en association avec le méthotrexate, soit l'association de plusieurs traitements de fond. La prévention des effets indésirables doit être systématique. Ces traitements exigent tous, au minimum, une surveillance hématologique par numération (risque d'agranulocytose, de thrombopénie) et hépatique par dosage des transaminases (risque de cytolyse). Le traitement de la douleur (par antalgiques ou anti-inflammatoires non stéroïdiens) doit être instauré et adapté en fonction de son intensité. Il existe différents algorithmes en fonction de l'activité et de l'évolutivité de la PR. L'emploi de drogues ciblées, telles que les anti-TNF- α , anti-cytokines (IL1 et IL6), anti-lymphocytes B CD20+ et anti-CTLA4-Ig, bloque ou freine

les détériorations structurales radiographiques articulaires et induit une rémission prolongée dans 30% des cas. Dans tous les cas, l'efficacité clinique est jugée sur des critères d'activité cliniques (nombre d'articulations gonflées, nombre d'articulations douloureuses, durée de la raideur matinale, niveau global d'activité évalué par le patient, niveau global d'activité jugé par le médecin) ; des critères biologiques (VS et CRP) et le calcul du DAS28.

L'évolution du titre des FR et des ACPA ne semble pas être corrélée à l'évolution clinique. Leur normalisation n'est pas un objectif thérapeutique. La répétition de leurs dosages n'est pas actuellement recommandée en dehors de protocoles ou d'essais thérapeutiques.

Enfin, en cas d'utilisation de drogues ciblées (anti-TNF- α , anti-CD20...), la présence d'auto-anticorps dirigés contre ces médicaments pourrait inhiber leur efficacité [19]. Toutefois, les études réalisées à ce jour font état de résultats non consensuels notamment quant à l'activité inhibitrice de ces anticorps sur la molécule utilisée. Ces dosages mis au point et commercialisés ne sont pas de pratique courante, et des essais cliniques prospectifs sont en cours. À noter qu'au cours de ces biothérapies ciblées, utilisées dans le traitement de la PR ou non, la production des AAN, anti-ADN natif ou anti-cardiolipides a été rapportée par plusieurs équipes, impliquant alors une prise en charge et une surveillance particulière [20].

D'autres auto-anticorps non spécifiques de la PR sont parfois observés : anti-Ro/SS-A, anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA), traduisant souvent la présence de certaines manifestations cliniques ou d'authentiques syndromes de chevauchement avec une autre affection auto-immune.

Conclusion

La recherche des ACPA constitue à ce jour le marqueur diagnostique le plus spécifique et le plus précoce de la PR. La recherche des FR reste néanmoins d'actualité car ces deux familles d'auto-anticorps apportent des informations non redondantes en pratique clinique. En effet, il existe de rares cas de PR avec FR positifs sans ACPA. La présence d'ACPA chez des patients présentant une arthrite débutante permet non seulement de contribuer au diagnostic précoce d'une PR mais aussi de prédire une évolution péjorative et ainsi de mettre en place plus rapidement des traitements adaptés susceptibles de contrôler la maladie et d'éviter l'apparition de lésions articulaires irréversibles.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Aletaha D, Tuhina N, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81.
- [2] Clot J, Pasquali JL. Les facteurs rhumatoïdes : méthodes de détection et interprétation. *Cahier de formation, Bioforma* 1999;13:13–24.

- [3] Haute Autorité de Santé. Polyarthrite rhumatoïde (PR): diagnostic et prise en charge initiale. Septembre 2007. http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_606479/polyarthrite-rhumatoide-diagnostic-et-prise-en-charge-initiale
- [4] Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995;95:2672–9.
- [5] Fabien N, Goetz J, Sordet C, Humbel RL, Sibilia J. Groupe d'étude de l'auto-immunité. Nouveaux auto-anticorps de la polyarthrite rhumatoïde: les auto-anticorps antipeptides ou protéines citrulinées et les autres. *Presse Med* 2008;37:1756–66.
- [6] Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, et al. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2004;71(6):493–502.
- [7] Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjoberg O, van Vollenhoven R, Klareskog L, et al. Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* 2008;58:36–45.
- [8] Van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2232–41.
- [9] Terrier B, Degand N, Guilpain P, Servettaz A, Guillemin L, Mouthon L. Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2007;6:176–82.
- [10] Iwaki-Egawa S, Matsuno H, Yudoh K, Nakazawa F, Miyazaki K, Ochiai A, et al. High diagnostic value of anticalpastatin autoantibodies in rheumatoid arthritis detected by ELISA using human erythrocyte calpastatin as antigen. *J Rheumatol* 2004;31:17–22.
- [11] van Beers JJ, Schwarte CM, Stammen-Vogelzangs J, Oosterink E, Bozic B, Puijn GJ. The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in Apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β -actin. *Arthritis Rheum* 2013;65:69–80.
- [12] Shi J, Knevel R, Suwannalai P, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:17372–7.
- [13] Lee DM, Schur PH. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003;62:870–4.
- [14] Dubucquoi S, Solau-Gervais E, Lefranc D, Marguerite L, Sibilia J, Goetz J, et al. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2004;63:415–9.
- [15] Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006;65:845–51.
- [16] Correia ML, Carvalho S, Fortuna J, Pereira MH. Comparison of three anti-CCP antibody tests and rheumatoid factor in RA and control Patients. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34:21–5.
- [17] Sauerland U, Becker H, Seidel M, Schotte H, Willeke P, Schorlat A, et al. Clinical utility of the anti-CCP assay: experiences with 700 patients. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:314–8.
- [18] Visser K, van der Heijde D. Optimal dosage and route of administration of methotrexate in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature. *Arthritis Rheum* 2009;68:1094–9.
- [19] Van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013, <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2013.4>.
- [20] Atzeni F, Talotta R, Benucci M, Salaffi F, Cassinotti A, Varisco A, et al. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 2013;12:703–8 [pii: S1568-9972(12)00279-0].



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE)

Extended-spectrum beta-lactamases

A. Philippon*

Faculté de médecine Paris-Descartes, Paris, France

Reçu le 19 avril 2013 ; accepté le 20 avril 2013

KEYWORDS

ESBL;
 CTX-M-types;
E. coli;
 Detection

MOTS CLÉS

BLSE ;
 C3G ;
 Type CTX-M ;
E. coli ;
 Détection

Summary Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) appeared some years after the introduction in hospital environment of unhydrolysable or extended-spectrum cephalosporins (ESC). The first step (1985) for resistance to ESC was related to the well-known broad-spectrum beta-lactamases (TEM/SHV) modified by mutation(s) such as in location 104, 164, 238, 240 (TEM-types). Some years later, such resistance, particularly against 3GC was linked to emergence of novel enzymes e.g. BES-1, CTX-M-1, PER-1, SFO-1, TLA-1, Toho-1, VEB-1... Such emergence will not stop with the recent identification of the types BEL-1 and PME-1. Nevertheless, a pandemy of CTX-M types such as CTX-M-15 is now characterized by isolation in community among *E. coli* strains from UTI. More recently was characterized a worldwide clone (025b:H4, ST131) combining multiresistance to antibiotics and virulence. Finally, ESBL are strictly defined as class A enzymes transferable but susceptible to inhibitors e.g. clavulanate. So far in practice, their detection is simple when using the breakpoints, c and C recently proposed (≤ 1 mg/L and > 2 or 4 mg/L) in combination with a synergy test. The correct identification of an ESBL requires a molecular approach reserved to expert laboratory.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) ont émergé peu de temps après l'introduction des céphalosporines de troisième génération (C3G). Il s'agissait dans un premier temps (1985) de pénicillinas connues (TEM/SHV) ayant modifié leur affinité pour les bêta-lactamines dont les C3G par mutation(s) (par exemple : positions 104, 164, 238, 240 pour les enzymes de type TEM). Quelques années plus tard, cette résistance, en particulier aux C3G, était en relation avec de nouvelles BLSE telles BES-1, CTX-M-1, PER-1, SFO-1, TLA-1, Toho-1, VEB-1... Cette émergence de nouveaux types ne devait plus s'arrêter avec les deux dernières : BEL-1, PME-1. Néanmoins, une véritable pandémie mondiale est maintenant observée avec la diffusion préférentielle des types CTX-M dont CTX-M-15, en particulier en milieu communautaire chez des souches de *E. coli* d'origine urinaire. Plus récemment, a été identifié un clone pandémique (025b:H4, ST131) pouvant associer la multirésistance aux antibiotiques à la virulence. Les

* 65, boulevard Lannes, 75116 Paris, France.

Adresses e-mail : philippona@free.fr, alain.philippon@univ-paris5.fr

BLSE se définissent comme des enzymes de la classe A transférables, donc sensibles aux inhibiteurs enzymatiques (acide clavulanique). En pratique de laboratoire, leur détection est simple d'autant que les concentrations c et C ont été récemment abaissées (≤ 1 mg/L et > 2 ou 4 mg/L) en combinant un test de synergie. Leur identification précise ne peut être que moléculaire et donc, réservée à des laboratoires spécialisés.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Introduction

Les bêta-lactamines constituent une famille d'antibiotiques très largement prescrite en clinique qui agissent en inhibant la biosynthèse du peptidoglycane, principal constituant de la paroi bactérienne par fixation préférentielle à diverses protéines liant les pénicillines (PLP/PBP), enzymes impliquées dans cette synthèse. Chez les bacilles à Gram-négatif (BGN), trois types de mécanismes de résistance, principalement acquise, ont été identifiés : la faible affinité pour les PLP, les phénomènes d'imperméabilité et d'efflux, et surtout l'inactivation enzymatique par des protéines, dénommées bêta-lactamases en raison de leur affinité pour le noyau bêta-lactame. Au fur et à mesure de l'introduction des bêta-lactamines ont émergé divers types enzymatiques. Ainsi, dans les années 1965, peu après l'introduction de l'ampicilline mais aussi des céphalosporines de première génération ont émergé les premières bêta-lactamases (*broad-spectrum*) dénommées pénicillinases (TEM-1/2, PIT-2/SHV-1) chez diverses entérobactéries lors d'infection urinaire telles *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*... Leur déterminisme génétique de type transposon porté sur divers plasmides a permis une large diffusion dans le monde bactérien (*Pseudomonas aeruginosa* dans les années 1970, *Haemophilus influenzae* dans les années 1975, puis *Neisseria gonorrhoeae*, plus tard *Acinetobacter baumannii*). Il convenait devant ce phénomène épidémique de résistance acquise de proposer des alternatives thérapeutiques par la découverte soit d'inhibiteurs enzymatiques (acide clavulanique, par exemple), soit de nouveaux composés d'hémisynthèse non hydrolysables tels les *extended-spectrum cephalosporins* développés dans les années 1975 à 1980 avec une activité intrinsèque très améliorée : ainsi pour *E. coli*, la CMI moyenne du céfuroxime était de $0,5$ mg/L alors qu'elle passait à $0,03$ mg/L pour le céfotaxime, d'où un classement sous le vocable de céphalosporines de troisième génération ou C3G et de quatrième génération ou C4G. Celles-ci se caractérisent par une plus grande stabilité vis-à-vis des céphalosporinases.

Malheureusement, leur utilisation intensive en milieu hospitalier dès les années 1980, en particulier dans les services de soins intensifs a été suivie de l'émergence en Allemagne en 1983, de souches de *Klebsiella pneumoniae* de sensibilité diminuée, puis dans les années 1985 en France mais aussi en Tunisie avec les premières souches de *Salmonella* [1,2]. Ce phénomène de souches de sensibilité diminuée aux C3G (deux tiers des souches avec des CMI ≤ 4 mg/L) a été d'autant perceptible dans notre pays qu'un test de dépistage bactériologique simple (synergie) permettait de repérer ces souches dans presque une vingtaine d'hôpitaux français dès 1988 (Fig. 1) [3].

L'identification de nouveaux types ou allèles ne devait plus s'arrêter (www.lahey.org/studies/webt.htm) ainsi que

l'émergence de nouvelles bêta-lactamases responsables de cette résistance aux pénicillines et surtout aux C3G/C4G.

Définitions

Définition historique de 1989

Les *Extended-Spectrum Beta-lactamases* (ESBL) sont des bêta-lactamases transférables mutées de la classe A (TEM/SHV) qui ont alors une affinité augmentée pour diverses bêta-lactamines dont les C3G [2].

Malheureusement, trois ans après, ont été dénommées ESBL, des enzymes transférables de la classe C tels BIL-1, CMY-1, MIR-1 responsables, il est vrai, de la résistance aux C3G mais aussi de nouveaux types appartenant à la classe A tel CTX-M et MEN-1 [1].

Il convient de préciser que quatre classes moléculaires de bêta-lactamases ont été identifiées dès les années 1980 : la classe A comprenant des pénicillinases, la classe B, des carbapénémases, la classe C des céphalosporinases et enfin la classe D, des oxacillinases. Enfin les classes A, C et D sont des sérines enzymes alors que la classe B inclut des métallo-enzymes [4].

Le terme de bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE) a été proposé en 1988, puis quelques années après, est apparu celui de bêta-lactamases à spectre étendu [2,3]. La préférence de l'une ou l'autre appellation varie selon le pays francophone.

Le succès de ce type d'enzymes ne devait plus s'arrêter avec l'identification de nombreuses BLSE décrites à travers le monde représentant alors un problème

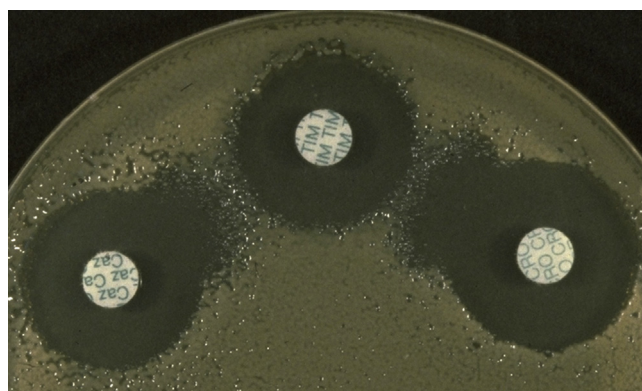


Figure 1 *Klebsiella pneumoniae* de sensibilité diminuée aux C3G : première synergie. Caz : ceftazidime ; CRO : ceftriaxone ; TIM : association de ticarcilline et d'acide clavulanique.

majeur de santé publique (consulter la base de données : www.lahey.org/studies/webt.htm).

Définition actuelle

Concernant la résistance acquise aux C3G, plusieurs propositions d'inclure sous le terme ESBL ou BLSE, des bêta-lactamases appartenant aux quatre classes (A, B, C, D) sont à rejeter à cause de l'importance clinique ou de l'interprétation à donner pour l'antibiogramme [4,5]. Aussi, la dénomination de BLSE ne doit s'appliquer qu'à des enzymes appartenant à la classe moléculaire A et au groupe fonctionnel 2be [5]. C'est-à-dire que le traitement à l'aide de céphamycines et de carbapénèmes reste possible. Il y a donc lieu de distinguer les enzymes des classes B (métallocarbapénémases), C (céphalosporinases) et D (oxacillinasés) des BLSE de classe A (cf. Spectre d'inactivation). Dans ce cas, la sensibilité des BLSE est habituelle vis-à-vis des inhibiteurs enzymatiques tel l'acide clavulanique et donc détectables en pratique au laboratoire (cf. Détection).

Plusieurs auteurs ajoutent dans les BLSE des enzymes de la classe D. Il existe, en effet, des oxacillinasés à spectre élargi qui ont évolué par mutation ; néanmoins, il convient d'avoir à l'esprit la définition actuelle de Bush et al. [5–7].

Spectre d'inactivation et interprétation

Le **Tableau 1** résume le comportement habituel des bêta-lactamines en fonction de la classe de bêta-lactamases (A, B, C, D) et des principaux types d'enzymes au sein de celles-ci.

Lors d'un phénotype de résistance de type pénicillinasés (PASE), il y a lieu de distinguer entre les enzymes de la classe A, sensibles aux inhibiteurs enzymatiques, acide clavulanique ou tazobactam par exemple de celles résistantes comme les PASES de la classe D.

Lors de résistance aux C3G (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime), il y a des différences de comportement en particulier pour les C4G entre BLSE, céphalosporinase hyperproduite (CASE HP), céphalosporinase à spectre élargi (CASE SE) et carbapénémase (CARB) (**Tableau 1**).

Si l'hyperproduction de la CASE (mutation du gène régulateur *ampD* et non celui de structure *ampC*) s'individualise par une résistance à diverses bêta-lactamines dont la ticarcilline, la pipéracilline, les céfamycines, les C3G ou encore l'aztréonam, quelques bêta-lactamines restent épargnées telles mécilinam, C4G (céfépime, cefpirome) et carbapénèmes (imipénème par exemple). Cependant, a émergé depuis quelques années en clinique, la résistance acquise aux C4G, initialement en France, puis dans d'autres pays par obtention de mutants de CASE ayant une meilleure affinité, d'où le terme de CASE à spectre élargi ou encore *extended-spectrum AmpC* (ESAC) [8]. Les rares souches cliniques isolées (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii* ou encore *E. coli*) sont souvent hyperproductrices de leur céphalosporinase chromosomique, par ailleurs modifiée soit par mutation ponctuelle, soit par délétion de plusieurs bases (9 à 12), au niveau de la région codante de l'*AmpC*, dite hélice alpha 10 [9]. Des mutants ponctuels in vitro ont déjà été rapportés et étaient liés à des substitutions d'acides aminés dans la même région du gène *ampC*. Ces deux types

de modification génique diminuent le K_m de l'enzyme qui a pour effet, d'augmenter le rapport k_{cat}/K_m vis-à-vis par exemple du céfépime. Ces mutants de CASE sont encore rares.

Finalement, on retiendra quelquefois la difficulté d'interpréter en raison de l'existence de certaines associations de mécanismes de résistance (cf. Détection).

Types de bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu

Premières bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu de type TEMnoniera (TEM) et *sulfi hydroxyl variable* (SHV)

De nombreux mutants de TEM-1/2 (plus de 190) ont été identifiés avec un phénotype BLSE (www.lahey.org/Studies/). Bien que fréquemment retrouvés chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, ces BLSE ont été aussi observées parmi d'autres espèces d'entérobactéries comme *E. cloacae*, *P. mirabilis* ainsi que chez *P. aeruginosa*. En France dans les années 2000, les BLSE les plus fréquentes appartenaient bien au groupe TEM comme TEM-3 chez diverses espèces d'entérobactéries, le groupe *sulfi hydroxyl variable* (SHV) étant peu représenté de même que celui CTX-M (<6,2% des souches productrices de BLSE de type SHV) [10–12]. En revanche, ces enquêtes ont indiqué la prédominance du type TEM-24 chez *E. aerogenes*. Les mutations responsables de l'élargissement ou l'extension du spectre sont retrouvées au niveau de quatre *hot spots* de l'enzyme (résidus 104, 164, 238 et 240 selon la numération de Ambler) (www.lahey.org/Studies/). Certains mutants de TEM ont été identifiés, en fait, dans d'autres *hot spots* entraînant une affinité diminuée pour les bêta-lactamines présentant ainsi une diminution de sensibilité aux inhibiteurs enzymatiques, acide clavulanique par exemple. On parlera de bêta-lactamases TEM résistantes aux inhibiteurs (TRI) ou *inhibitor resistant TEM* (IRT). Enfin, de rares mutants présentent des substitutions propres aux BLSE et aux TRI/IRT, le terme de bêta-lactamases *complex mutant TEM* (CMT) est utilisé.

Simultanément ont été découverts les dérivés ou mutants de SHV-1 (>160), enzyme chromosomique chez *K. pneumoniae*, cousine de PIT-2 ou encore OHIO-1, les BLSE SHV-5 et SHV-12 étant les mutants les plus fréquents en Europe. Ces BLSE ont été détectées parmi de nombreuses entérobactéries (notamment *K. pneumoniae*) mais aussi chez *P. aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* Comme les variants de TEM, les substitutions d'acides aminés dans SHV-1 (68% d'identité avec TEM-1) ont lieu classiquement au niveau de quelques résidus, notamment 238 et 240 (www.lahey.org/Studies/).

Outre les mutants de TEM ou SHV dont le nombre est devenu conséquent, d'autres types enzymatiques ont émergé quelques années après et sont même devenus prépondérants comme le groupe CTX-M (**Tableau 2**) [6,7,12].

Nouvelles bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu du groupe céfotaximase-Muenchen

Le type céfotaximase-Muenchen (CTX-M) conférerait à l'origine, chez les entérobactéries, un plus haut niveau

Tableau 1 Bêta-lactamines : comportement habituel en fonction du type de bêta-lactamase.

	PASE	BLSE	CASE	CASE HP	CASE SE	CARB
Amoxicilline	R	R	R	R	R	R
Amoxicilline + AC	S/I/R	S	R	R	R	R
Ticarcilline	R	R	S	R	R	R
Ticarcilline + AC	S/I/R	S	S	R	R	R
Pipéracilline	R	R	S	R	R	R
Pipéracilline + PTZ	S/I/R	S	S	R	R	R
Céfalogtine	I/R	R	R	R	R	R
Céfamandole	I/R	R	S	R	R	R
Céfuroxime	S/I	R	S	R	R	R
Céfoxitine	S	S	R	R	R	R
Céfotaxime	S	R	S	R	R	R
Ceftazidime	S	R	S	R	R	R
Céfépime	S	R	S	S	R	R
Cefpirome	S	R	S	S	R	R
Aztréonam	S	R	S	R	R	V
Imipénème	S	S	S	S	S	R
Méropénème	S	S	S	S	S	R
Ertapénème	S	S	S	S	S	R

PASE : pénicillinase ; BLSE : bêta-lactamase à spectre élargi/étendu ; CASE : céphalosporinase inductible ; CASE HP : céphalosporinase hyperproduite ou plasmidique ; CASE SE : céphalosporinase à spectre élargi/étendu ; CARB : carbapénémase ; R : résistant ; S : sensible ; I : intermédiaire ; AC : acide clavulanique ; PTZ : tazobactam.

de résistance au céfotaxime (ou ceftriaxone) céfépime et aztréonam qu'à la ceftazidime [13]. Certains types ont reçu à l'origine, d'autres dénominations tels MEN-1 (malade italien hospitalisé en France), FEC-1 et Toho-1 au Japon (fecal *E. coli* et nom de l'université) (Tableau 2).

Certaines d'entre elles ont ensuite évolué vers un haut niveau de résistance à la ceftazidime telles les enzymes CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23 ou encore CTX-M-32 dérivant par simple mutation (Asp240Gly) de CTX-M-1 [13]. Ce groupe d'enzymes rencontré chez diverses espèces de bacilles à Gram-négatif telles entérobactéries (*E. coli*,

Tableau 2 Découverte des autres bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu transférables : quelques caractéristiques.

BEL-1	<i>P. aeruginosa</i>	Belgique (2004)
BES-1	<i>S. marcescens</i>	Brésil (1996)
CTX-M-1	<i>E. coli</i>	Allemagne (1989), Portugal (2003)
CTX-M-2	<i>S. typhimurium</i> , <i>V. cholerae</i>	Argentine (1992)
	Entérobactéries	Argentine (1992), Israël (1992), Brésil (1997), France (1997)
FEC-1	<i>E. coli</i>	Japon (1986)
GES-1	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	France-Guyane (1998), Portugal (1999), France (2001)
GES-9	<i>P. aeruginosa</i>	France (2004)
IBC-1	<i>E. cloacae</i>	Grèce (1999)
MEN-1	<i>E. coli</i>	France (Italie) (1989)
OXY-1	<i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Espagne (2008)
PER-1	<i>P. aeruginosa</i>	France (1991), France (2001)
	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>	Turquie (1992)
	<i>A. baumannii</i>	Turquie (1995?), France (1998)
PER-2	<i>S. typhimurium</i>	Argentine (1990)
	<i>V. cholerae</i>	Argentine (1992)
PME-1	<i>P. aeruginosa</i>	États-Unis (2008)
RTG-4	<i>A. baumannii</i>	France (2007)
SFO-1	<i>E. cloacae</i>	Japon (1988), Espagne (2011)
TLA-1	<i>E. coli</i>	Mexique (1991)
Toho-1	<i>E. coli</i>	Japon (1993)
Toho-1a	<i>S. flexneri</i>	Argentine (> 1995)
VEB-1	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	France (Vietnam) (1996)
	<i>P. aeruginosa</i>	Thaïlande (1999)

K. pneumoniae, *P. mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella* sp.) ou autres (*Vibrio cholerae*) va connaître un extraordinaire essor [6,7,13].

La phylogénie de ces nouvelles BLSE montre un regroupement au sein de branches avec les groupes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 et CTX-M-25 (www.lahey.org/studies/inc_webt.asp). Les analyses génétiques ont montré que les gènes progéniteurs appartiennent au genre *Kluyvera*, entérobactéries d'isolement très rare en bactériologie médicale (Fig. 1) [13]. Ainsi, le phylum CTX-M-2 dérive de la bêta-lactamase naturelle de *Kluyvera ascorbata* [14]. L'environnement génétique de plusieurs CTX-M a permis de découvrir l'existence de structures génétiques inconnues telle séquence d'insertion ISEcp1 apportant un promoteur ou encore l'orf513 ou *insertion sequence common region* (ISCR1) [13]. Enfin, on retrouve souvent de part et d'autre du gène bêta-lactamase, des régions correspondant au chromosome du progéniteur confirmant la mobilisation de tels gènes chromosomiques. Si le mécanisme exact de la mobilisation de ces gènes est encore mal précisé, il reste la question essentielle du lieu de capture de ces gènes : environnement hydrique, tellurique, alimentaire.

Les toutes dernières bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu

Les toutes dernières BLSE (Tableau 2), caractérisées par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréonam plutôt qu'au céfotaxime, ont une distribution moins large que le groupe précédent [6,7]. Dans ce groupe sont individualisées BEL-1 (Belgium Extended Spectrum), BES-1 (Brazilian Extended Spectrum), GES-1 (Guyana Extended Spectrum), OXY-1 (*K. oxytoca*), PME-1 (*Pseudomonas aeruginosa*), PER-1 (*Pseudomonas* Extended Spectrum), SFO-1 (*Serratia fonticola*), TLA-1 (Tlahuicas, tribu mexicaine) ou encore VEB-1 (Vietnam Extended Spectrum) (Tableau 1). Des enzymes proches de GES-1 ont été découvertes en Grèce, dénommées à tort *integron borne cephalosporinase* (IBC) (IBC-1, IBC-2), ce nom d'enzyme caractérisant celles de la classe C, et non A.

La dénomination de certaines de ces nouvelles enzymes rend compte d'une distribution géographique préférentielle. Ainsi, l'enzyme BEL-1 n'est rapportée à ce jour qu'en Belgique, VEB-1 est très répandue dans le Sud-Est Asiatique. Enfin, TLA-1 n'a été observé qu'au Mexique. En revanche, l'enzyme plasmidique TLA-2 a été identifiée dans une bactérie inconnue à partir d'eaux de traitement de plantes usées en Allemagne en 2002 [6].

Néanmoins, certaines d'entre elles peuvent être observées en France comme PER-1, GES-1 et même sous une forme épidémique tel VEB-1 chez *A. baumannii* [6].

Certaines BLSE sont très rares, mais elles témoignent des possibilités de mobilisation de gènes chromosomiques d'espèces environnementales. Ainsi, la bêta-lactamase plasmidique SFO-1 n'a été identifiée qu'à trois reprises chez des souches de *E. cloacae* au Japon et plus récemment, en Espagne ou encore en Chine chez des souches de *K. pneumoniae* [15,16]. Cette enzyme présente la particularité d'être quelquefois inductible et d'avoir pour progéniteur, une entérobactérie d'isolement rare en

bactériologie médicale, l'espèce *Serratia fonticola*. La bêta-lactamase chromosomique de *K. oxytoca* (*bla_{OXY}*) vient d'être identifiée sur un plasmide dans une souche de *K. pneumoniae* en Espagne [17].

En effet, les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés dans des structures de type intégron comme gènes cassettes (VEB-1, GES-1, GES-3...) et donc, sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase. L'insertion d'une Insertion Sequence (IS) peut générer une synthèse augmentée.

La Fig. 2 illustre l'étonnante diversité des bêta-lactamases de classe A dont celles de type BLSE. Les homologies de séquences peptidiques entre elles sont quelquefois faibles (< 30 %), car les gènes peuvent être mobilisés d'espèces bactériennes très différentes. Par ailleurs, elles illustrent le potentiel d'adaptation de ces enzymes entre, par exemple, les types TEM/SHV et celles de type CTX-M, compte tenu de très nombreux allèles identifiés (plus de 300 actuellement pour ceux de type TEM/SHV et...) (www.lahey.org/studies/webt.htm).

Épidémiologie

Jusqu'à la fin des années 1990, la majorité des BLSE identifiées étaient des mutants de TEM-1/2 ou SHV-1. Les souches productrices étaient souvent associées à des épidémies nosocomiales, notamment dans les unités de soins intensifs ou service de réanimation. La prévalence des BLSE était plus forte chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Enfin, les principaux facteurs de risque avaient été identifiés : admission en réanimation, hospitalisation prolongée, chirurgie abdominale, cathétérisme IV, sondage urinaire, ventilation assistée, hémodialyse, plusieurs cures d'antibiothérapie dont celles avec les C3G [1,7,18].

Les souches productrices des nouvelles BLSE ont été initialement rapportées de façon plus ou moins sporadique à la fin des années 1980 et au début de 1990 en Europe (MEN-1, CTX-M-1, PER-1), au Japon (SFO-1, Toho-1) et en Argentine (CTX-M-2, PER-2) ou encore au Mexique (TLA-1) [6,8].

À partir de 1995, les « nouvelles » BLSE dont les types CTX-M ont alors émergé de façon explosive chez les entérobactéries et la situation épidémiologique a considérablement évolué au niveau planétaire, d'où le terme de « pandémie CTX-M » accompagnée de taux de prévalence conséquents, par exemple chez *E. coli* (30–90 %) et *K. pneumoniae* (10–60 %) dans divers pays dont l'Espagne, l'Italie, la Corée du Sud ou encore Taïwan [18,19]. La situation française montre une forte augmentation de la résistance au céfotaxime. Ainsi chez *E. coli*, elle est passée de 0,8 % à 8,2 % entre 2002 et 2011 et chez *K. pneumoniae* de 4,1 % en 2005 à 25,3 % en 2011 (www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/TESSy/Pages/TESSy.aspx). Si la prévalence de ce type de bêta-lactamases est plus élevée en milieu hospitalier, quelques enquêtes françaises précisent mieux la situation en pratique de ville, en particulier l'enquête nationale diligentée par l'ONERBA sur une période de deux mois en 2006 montre une prévalence faible de 1,1 % avec une majorité de *E. coli* (66,7 %) de type CTX-M dont CTX-M-15 [10–12,20]. Pour ce dernier type enzymatique, il s'agissait du même clone épidémique (phylogroupe B2, ST131, sérotype

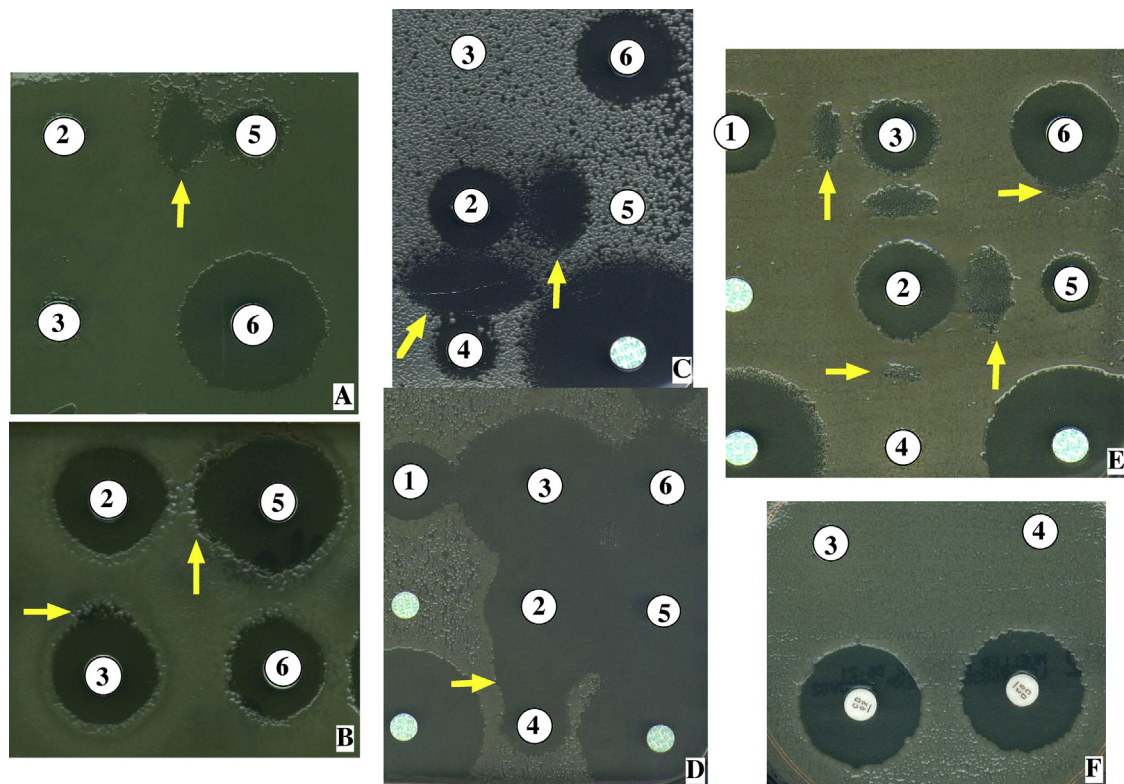


Figure 3 Synergies : modalités de détection des BLSE. 1 : amoxicilline + acide clavulanique ; 2 : ticarcilline + acide clavulanique ; 3 : ceftazidime ; 4 : céfotaxime ; 5 : aztréonam ; 6 : pipéracilline + tazobactam. Les flèches blanches indiquent les synergies. En A (*P. aeruginosa*), B (*P. aeruginosa*), C, D, E (entérobactéries) : tests par diffusion. En F (*E. aerogenes*) : test avec un mélange de C3G et d'acide clavulanique (disques Oxoid).

Enfin, il convient d'indiquer que l'association de plusieurs bêta-lactamases à médiation plasmidique n'est plus exceptionnelle aussi bien chez l'homme que chez l'animal telles BLSE associée à une céphalosporinase plasmidique (CMY-2, DHA-1 par exemple), voire à une carbapénémase [7,16,32,33].

Détection – Interprétation

Historiquement, l'expression phénotypique des premières BLSE posait problème en raison d'une expression insuffisante de la résistance aux C3G par rapport à la concentration critique (c) de 4 mg/L proposée à l'époque par le CA-SFM. La proposition européenne récente des concentrations suivantes ($c \leq 1$ mg/L, $C > 2$ ou 4 mg/L) améliore de manière conséquente l'individualisation des souches résistantes ou intermédiaires par ce mécanisme (<http://www.sfm-microbiologie.org/>). Cependant, leur détection directe peut être nécessaire pour des raisons épidémiologiques ou d'hygiène, elle reste basée sur la mise en évidence d'une synergie (enzymes de la classe A), par exemple entre un disque de C3G (céfotaxime, ceftazidime et/ou aztréonam) et un disque d'Augmentin® (méthode de diffusion), la distance séparant les disques étant de 30 mm, centre à centre. La Fig. 3 montre des exemples différents de synergie selon le niveau de résistance et le type de BLSE testé (TEM, SHV, CTX-M). On notera que la détection

de la BLSE peut être négative avec une C3G, par exemple la ceftazidime mais positive avec l'aztréonam (voir A et C). À l'inverse, la céfotaximase CTX-M-1 apparaît sensible vis-à-vis de la ceftazidime et de l'aztréonam, mais une excellente synergie est visualisée avec le céfotaxime (D). Le niveau de synergie est très élevé, la synergie peut être visible dans la zone de diffusion à distance des disques eux-mêmes (E).

Plusieurs circonstances en pratique de laboratoire peuvent rendre quelquefois difficile la détection de la synergie (≥ 5 mm), voire neutraliser la synergie. La Fig. 4 illustre quelques situations d'absence de synergie suffisante détectable. La synergie existe (1), mais elle n'a pas été détectée, soit en raison d'un niveau de résistance trop élevé ou au contraire pas assez élevé. Dans la première éventualité, la détection de la résistance aux C3G ne pose aucun problème, mais vouloir rechercher une synergie par une détermination de la CMI par une méthode de dilution avec des concentrations élevées de C3G n'a pas beaucoup de sens. L'envoi à un laboratoire spécialisé peut être l'alternative. En revanche, la deuxième éventualité (2) est observable avec des souches productrices, par exemple *P. mirabilis*, voire *Providencia stuartii*. La solution consiste à refaire un antibiogramme en écartant les disques (40–45 mm, centre à centre) ou à augmenter l'inoculum. La deuxième éventualité (2) est une synergie douteuse, en raison par exemple d'un mécanisme d'imperméabilité ou d'efflux. Les modalités de tester l'inhibiteur associé à une C3G sur le même support, soit dans

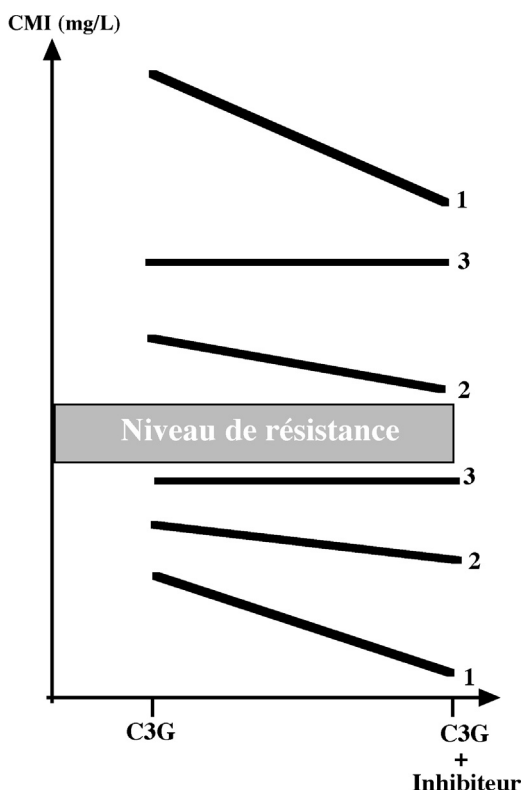


Figure 4 Représentation schématique des difficultés de détection d'une synergie.

le disque, soit dans la bandelette sont un peu plus sensibles que la technique classique (synergie par diffusion). Chez *P. aeruginosa*, la détection d'une BLSE est plus aléatoire encore en raison de l'éventuelle association de plusieurs mécanismes de résistance dont l'augmentation d'expression d'un ou plusieurs systèmes d'efflux, il sera nécessaire de rapprocher le disque d'Augmentin® de celui contenant la ceftazidime (15 mm au lieu de 30 mm, centre à centre). Chez cette dernière espèce, sont plus fréquemment détectées en France, SHV-2a ou encore PER-1.

La troisième éventualité (3) est celle, en fait, d'une souche nettement résistante aux C3G appartenant aux espèces suivantes : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Morganella morganii*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. La recherche d'une synergie est à rechercher avec une C4G (céfépime, ceftiofime) compte tenu de la possibilité d'une souche, par ailleurs, hyperproductrice de leur céphalosporinase (Tableau 1). La confirmation de ce mécanisme associé consiste à effectuer un nouvel antibiogramme avec un milieu gélosé supplémenté avec 250 mg/L de cloxacilline, puissant inhibiteur de céphalosporinase (classe C).

Il existe bien évidemment d'autres modalités de faire un antibiogramme, comme l'usage de divers automates tels Mini-API®, Phoenix®, Vitek2®, Vitekcompact®, Walkaway® très utilisés en pratique libérale, la synergie recherchée devant être d'au moins 3 log₂ (CA-SFM). Peu de problèmes semblent devoir être rapportés pour les entérobactéries du groupe 1 (*E. coli*, *P. mirabilis*, *Shigella* sp. *S. enterica*) et celles du groupe 2 (*K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia hermannii*, *Raoultella* sp.). Néanmoins, pour

Tableau 3 Évaluation comparée (%) de la détection des bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu chez 147 souches d'entérobactéries [34].

Méthode	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
TDS	92,9	96,6	97,5	90,5
TDI	94,1	81,4	87,9	90,6
E-test®	94,1	84,7	89,9	90,9
Microscan®	83,5	72,9	81,6	75,4
Phoenix®	98,8	52,2	75	96,6
Vitek2®	85,9	78	84,9	96,6

TDS : test de synergie du double disque ; TDI : test de synergie avec un disque contenant une C3G et l'acide clavulanique ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative.

celles du groupe 3 (céphalosporinase+), la détection est plus aléatoire lors d'hyperproduction de l'enzyme chromosomique. On peut regretter de ne pas disposer de plus d'études comparant ces diverses méthodes. Néanmoins, celles de Wiegand et al. de 2007 vient confirmer la place de ces diverses méthodes avec quelques différences selon l'espèce bactérienne ou le mécanisme (Tableau 3) [34]. On relèvera que la méthode bactériologique classique, à savoir le test de double synergie, conserve toute sa place. Il convient d'avoir à l'esprit que chez une entérobactérie, la synergie entre l'acide clavulanique et une C3G, voire une C4G, fait évoquer une BLSE. Cependant, un distinguo épidémiologique doit être établi entre les BLSE plasmidiques multirésistantes aux antibiotiques et responsables d'épidémies et celles chromosomiques, quelquefois hyperproduites comme par exemple chez *K. oxytoca*, *Citrobacter amalonatica*, *Citrobacter sedlakii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri* (Fig. 1) [35].

En pratique courante de laboratoire, il est inutile de vouloir poursuivre l'identification d'une BLSE, car seule une PCR suivie surtout d'un séquençage (choix important d'amorces) permettra une identification précise, compte tenu de la diversité de séquences de ces enzymes (Fig. 1). Aussi, cette approche diagnostique sera réservée à des laboratoires hospitaliers ou de recherche.

En termes d'interprétation et selon la classification de Bush et al., les BLSE font partie du groupe 2be, c'est-à-dire qu'elles sont capables d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines de première, deuxième, troisième (ex. céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et quatrième [C4G] (céfépime, ceftiofime) génération et les monobactames (aztréonam) [4]. Les souches BLSE+ restent généralement sensibles aux céphamycines (ex. céfoxitine, céfotétan) et aux carbapénèmes (imipénème, ertapénème).

Traitement – Prophylaxie

Plusieurs rapports récents proposent un certain nombre de recommandations relatives aux mesures à mettre en œuvre pour prévenir l'émergence des entérobactéries BLSE dont *E. coli* et lutter contre leur dissémination (Google®, taper : rapport ESBL Belgique ou BLSE recommandations HCSP). Il est vrai que le rapport du Haut Conseil de la santé publique (HCSP) cible pour notre pays, un certain nombre de mesures, déjà bien connues et applicables en milieu hospitalier. Cette lutte est un devoir de santé publique. Ce

rapport rappelle combien l'usage des antibiotiques doit être justifié. Si les souches de *E. coli* BLSE+ principalement de type CTX-M isolées lors d'infections urinaires sont multi-résistantes, il conviendra cependant d'éviter de prescrire abusivement des carbapénèmes, imipénème par exemple, antibiotiques à garder impérativement en réserve pour une infection sévère. Outre le concept du « bon usage » devrait s'ajouter de celui de « moindre usage ».

Si le choix de l'antibiothérapie probabiliste reste difficile en milieu hospitalier du fait de la résistance des souches aux différentes bêta-lactamines et de la fréquence des corésistances, il convient de préciser que l'épidémiologie de la résistance bactérienne en France ne justifie pas, à ce jour, la modification de nos pratiques [36]. Ainsi, certaines antibiothérapies probabilistes n'ont pas à être modifiées actuellement comme celle des infections urinaires communautaires. Toutefois, rares sont les bêta-lactamines encore disponibles comme la céfoxitine, la témocilline, le piv-mecillinam, prodrogue du mecillinam, très prescrit dans les infections urinaires basses, au moins, dans le nord de l'Europe. La fosfomycine ainsi que la nitrofurantoïne peuvent être utiles en cas de cystite.

En milieu hospitalier, à l'usage un peu systématique des C3G et FQ pourra être substitué celui des aminosides comme dans les infections urinaires de type pyélonéphrite ou prostatite.

Il conviendra d'éviter la transmission croisée. Les mesures de dépistage ou de détection des porteurs sera plus systématique en milieu hospitalier et même à l'admission en tenant compte des facteurs de risque tels que : patients issus des maisons de retraite ou d'unités de soins de longue durée (colonisation urinaire et/ou digestive), patients ayant reçu une antibiothérapie préalablement à l'admission avec des antécédents de traitement par bêta-lactamine ou fluoroquinolone, contexte nosocomial, âge élevé, sexe féminin, existence de comorbidités, diabète, infections urinaires récidivantes, sondage urinaire, chirurgie... [24,25,36].

Pour les patients infectés ou colonisés, en particulier à domicile et dans les collectivités autres que les établissements de santé et les EHPAD (établissements scolaires...), l'accent sera mis sur l'hygiène des mains ainsi que l'hygiène générale autour de la toilette et de l'alimentation.

L'intensification de l'usage des produits hydroalcooliques pour les soignants mais aussi les patients colonisés sera mise en œuvre. Des fiches techniques relatives à la gestion des excréta, des déchets associés aux soins et du linge souillé sont d'ailleurs maintenant disponibles dans le rapport du HCSP (Google®, taper : BLSE recommandations HCSP). Cette problématique nouvelle du traitement des effluents intéresse pour le moment surtout les établissements de santé. Enfin, la mise en évidence d'une colonisation digestive ne justifie pas un traitement de celle-ci.

Conclusion

Presque trois décennies après leur découverte, les BLSE initialement cantonnées dans les années 1985 chez l'espèce *K. pneumoniae* lors d'infections nosocomiales dans les services hospitaliers de soins intensifs de la vieille Europe comme l'Allemagne et la France sont maintenant aisément identifiées à l'échelle planétaire, aussi aucun continent

n'échappe à leur mondialisation. Celles-ci illustrent le formidable potentiel d'adaptation des bactéries avec dans un premier temps, la sélection de variants ou mutants ponctuels de pénicillinasés plasmidiques (TEM/SHV) identifiées peu de temps après l'introduction des aminopénicillines dans les années 1960. Les années 1990 ont été marquées par l'émergence de nouvelles BLSE telles CTX-M-1, MEN-1, SFO-1, TLA-1, Toho-1, PER-1 avec finalement après 2000, la diffusion, presque exclusive des BLSE de type CTX-M, même dans une espèce zoonotique comme *S. enterica*. Cependant, le problème de santé publique le plus aigu concerne l'émergence actuelle d'infections urinaires communautaires à *E. coli*, producteur de BLSE. Tout biologiste en 2013 ne peut donc ignorer comment les détecter afin de mettre en œuvre les mesures de contrôle les mieux adaptées évitant leur dissémination. Cependant, l'isolement de souches productrices de BLSE hautement résistantes (BHR), voire totorésistantes (BTR) amènent à se questionner sur le positionnement de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1697–704.
- [2] Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(Suppl. 5):1131–6.
- [3] Philippon A, Fournier G, Paul G, et al. Détection et distribution des bêta-lactamases à spectre élargi chez les entérobactéries. *Med Mal Infect* 1988;12:869–76.
- [4] Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211–33.
- [5] Bush K, Jacoby GA, Amicosante G, et al. Comment on: redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:212–3.
- [6] Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):42–52.
- [7] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657–86.
- [8] Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:161–82.
- [9] Philippon A, Arlet G. Bêta-lactamases des bactéries à Gram-négatif : le mouvement perpétuel. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006;64:37–51.
- [10] Brasme L, Nordmann P, Fidel F, et al. Incidence of class A extended-spectrum beta-lactamases in Champagne-Ardenne (France): a 1 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:956–64.
- [11] De Champs C, Chanal C, Sirot D, et al. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum beta-lactamases in hospitals of the Auvergne France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:634–9.
- [12] De Champs C, Sirot D, Chanal CF, et al. A 1998 Survey of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae in France. *J Antimicrob Chemother* 2000;44:3177–9.
- [13] Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1–14.

- [14] Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, et al. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3045–9.
- [15] Ferna'ndez A, Pereira MJ, Sua'rez JM, et al. Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2011;49:822–8.
- [16] Guo Q, Wang P, Ma Y, Yang Y, et al. Co-production of SFO-1 and DHA-1 beta-lactamases and 16S rRNA methylase ArmA in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2361–6.
- [17] González-Lo'pez JJ, Coelho A, Larrosa MN, et al. First detection of plasmid-encoded blaOXY beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3143–6.
- [18] Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:466–75.
- [19] Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:165–74.
- [20] Arpin C, Quentin C, Grobost F, et al. Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase -producing *Enterobacteriaceae* in the French community setting. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1205–14.
- [21] Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 2013;207:919–28.
- [22] Lavigne JP, Vergunst AC, Goret L, et al. Virulence potential and genomic mapping of the worldwide clone *Escherichia coli* ST131. *PLoS One* 2012;7:e34294.
- [23] Nicolas-Chanoine MH, Jarlier V, Robert J, et al. Patient's origin and lifestyle associated with CTX-M-producing *Escherichia coli*: a case-control-control study. *PLoS One* 2012;7:e30498.
- [24] Ben-Ami R, Rodriguez-Ban'o J, Arslan H, et al. A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2009;49:682–90.
- [25] Nicolas-Chanoine MH, Gruson C, Bialek-Davenet S., et al. 10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother* 2003;68:562–8.
- [26] Fabre L, Delauné A, Espié E, et al. Chromosomal integration of the extended-spectrum beta-lactamase gene blaCTX-M-15 in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1808–16.
- [27] Hendriksen RS, Mikoleit M, Kornschöber C, et al. Emergence of multidrug-resistant salmonella concord infections in Europe and the United States in children adopted from Ethiopia 2003–2007. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:814–8.
- [28] Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, et al. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis* 2011;204:675–84.
- [29] Weill F.X., Le Hello S. CNR Salmonella, rapport d'activité 2009 (71 pages) (sur Google®, taper: cnr salmonella rapport 2009).
- [30] Ma J, Zeng Z, Chen Z, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:519–24.
- [31] Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. *Front Microbiol* 2012;3:24.
- [32] Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, et al. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect* 2006;8:1945–54.
- [33] Lin CF, Hsu SK, Chen CH, et al. Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. *J Med Microbiol* 2010;59:665–71.
- [34] Wiegand I, Geiss HK, Mack D, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 2007;45:1167–74.
- [35] Philippon A, Arlet G. Entérobactéries et bêta-lactamines : phénotypes de résistance naturelle. *Pathol Biol (Paris)* 2012;60:112–26.
- [36] Zahar JR, Bille E, Schnell D, et al. Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de bêta-lactamase à spectre élargi (EBLSE). *Med Sci* 2009;25:939–44.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Spectrométrie de masse et microbiologie



Mass spectrometry and microbiology

A. Gravet*, M. Gessier

Laboratoire de microbiologie, hôpital Emile-Muller, 20, avenue du Dr-Laennec, 68070 Mulhouse, France

Reçu le 17 septembre 2013 ; accepté le 22 septembre 2013

KEYWORDS

Microbiology;
Bacteriology;
MALDI-TOF;
Mass spectrometry;
Microorganism
identification;
Routine laboratory

Summary Matrix laser desorption assisted time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is applied for identification of microorganisms in more and more hospital or private laboratories. The technique is easy to use, fast and reliable. MALDI-TOF MS identification is an efficient method, included fastidious bacteria and replaces more and more conventional identification techniques for bacterial and fungal strains. It is widely used in routine laboratory practice because of its economical and diagnostic benefits. The databases are gradually enhancing significant new taxa, requiring controlled and rigorous development. The specific standardized protocols are established to identify mycobacteria, filamentous fungi. Several systems available for routine procedures are equally systems in terms of analytical efficiency. The MALDI-TOF MS is a relevant tool for detection of resistance as well as identification of microorganism in sample. The opportunities are important, this technology is a potential efficient tool for epidemiological studies and for taxonomical classification. It also includes limits that must be integrated and managed into the routine laboratory while keeping the side expert of the technician and the biologist.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

MOTS CLÉS

Microbiologie ;
Bactériologie ;
MALDI-TOF ;
Spectrométrie de
masse ;
Identification ;
Laboratoire de
routine

Résumé La technique *Matrix laser desorption assisted time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF) est une nouvelle technique d'identification des microorganismes utilisée dans un nombre croissant de laboratoires publics et privés. Elle est facile à utiliser, rapide, fiable et économique. La méthode est très performante, y compris pour l'identification des bactéries fastidieuses, des mycobactéries, des champignons filamenteux. Des protocoles normalisés spécifiques de préparation des dépôts sont mis au point pour identifier certains microorganismes. Les bases de données sont régulièrement améliorées par l'inclusion de nouveaux taxons. Ces ajouts doivent être contrôlés et rigoureux. Plusieurs systèmes sont disponibles sur le marché, avec des résultats globalement comparables en termes d'efficacité analytique. La spectrométrie de masse est un outil pertinent pour la détection de la résistance des bactéries aux antibiotiques, l'identification directement dans l'échantillon mais des développements sont nécessaires pour l'intégration à la routine. Les perspectives de développement sont importantes, cette technologie est un outil potentiellement efficace pour les études épidémiologiques

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : graveta@ch-mulhouse.fr, alain.gravet@orange.fr (A. Gravet).

et pour classification taxonomique. Elle comprend également des limites et doit être intégrée dans le laboratoire de routine tout en préservant l'expertise des techniciens et des biologistes.
© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Introduction

Jusqu'à la fin des années 1990, la spectrométrie de masse est réservée aux laboratoires de biochimie ou de recherche. Le développement de la technique *Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight* (MALDI-TOF) a permis l'application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. Depuis 4 à 5 ans, les premiers spectromètres de masse ont fait leur apparition dans les laboratoires d'analyses, utilisés pour l'identification des microorganismes en routine dans de nombreux laboratoires hospitaliers universitaires ou non, dans des laboratoires d'analyse du secteur privé. De nombreuses études ont montré que la technique MALDI-TOF est une technique d'identification rapide, fiable et rentable. Nous étudierons ici plus particulièrement les différentes solutions actuellement proposées. Nous rapporterons notre expérience dans l'utilisation quotidienne de la technique ainsi que les changements engendrés dans le flux de travail du laboratoire. Enfin, nous envisagerons les possibilités offertes par la technique et ses futurs développements et applications ainsi que ses limites.

Principe et historique [1]

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Le premier spectromètre de masse a été conçu par Francis William Aston en 1919. L'ensemble était constitué de l'association d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur (Fig. 1). Tous les spectromètres de masse répondent à ce schéma de base. La source produit des ions, puis l'analyseur de masse permet une séparation des ions formés en fonction du rapport m/z (masse sur charge). Cette séparation se fait grâce à l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques [2]. Enfin, l'analyseur permet la détection des ions, un traitement informatique permettant d'obtenir un spectre. Pour l'identification des microorganismes la contrainte était d'étudier des protéines incluses dans des bactéries, donc d'extraire les protéines sans trop les dénaturer afin de pouvoir les séparer ensuite en fonction de leur taille. Dans les années 1980 a été mis au point la source MALDI qui permet une désorption-ionisation douce des macromolécules biologiques (peptides, protéines) pour une analyse en spectrométrie sur cellules entières [1,2]. Le microorganisme à identifier est mis en contact avec une matrice. Cette dernière permet un éclatement du microorganisme, elle capte l'énergie du laser qu'elle transfère aux protéines permettant l'addition d'un ion (H^+ , Na^+ , K^+ , NH^+) ou d'un électron, ou, à la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé (hydrure ou proton) à la protéine. Cette technique d'ionisation associée à l'analyseur à temps de vol, a permis d'obtenir des spectres dont les

pics étaient représentatifs des protéines ribosomales et membranaires. Ces spectres se sont ensuite révélés être spécifiques d'espèces de microorganisme et suffisamment précis et discriminants. S'ouvrait alors le développement de cette nouvelle technique d'identification. Des spectromètres de masse dont les performances sont adaptées à obtenir des spectres suffisamment discriminants ont été développés et commercialisés.

Deux firmes fabriquant des spectromètres de masse ont développé une version adaptée à l'identification et pouvant s'intégrer dans les laboratoires d'analyses de biologie médicales : le MicroFlex LT® (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) et l'Axima® de Shimadzu, tous deux équipés d'un laser (337 nm). Il varie dans leur type de source : à azote qui tire à une fréquence de 60 Hz pour leur premier, à nitrogène utilisée avec une fréquence de 50 Hz pour le second. Le Microflex® a une longueur du trajet dans le tube à vide de 1,05 m. La source d'ionisation est équipée d'une extraction retardée (délai de 400 ns) et les spectres sont enregistrés en mode positif dans une gamme de mesure allant de 2 à 20 kDa. L'analyseur TOF fonctionne également en mode linéaire où un vide poussé est maintenu (10^{-10} Bar). Chaque spectre, comparé à la base de données, est obtenu à partir de 240 tirs lasers [1]. L'Axima® a une longueur de trajet dans le tube à vide de 1,2 m. La source MALDI est équipée d'une extraction retardée, les spectres y sont enregistrés en mode positif dans une gamme de mesure allant de 3 à 20 kDa. L'analyseur

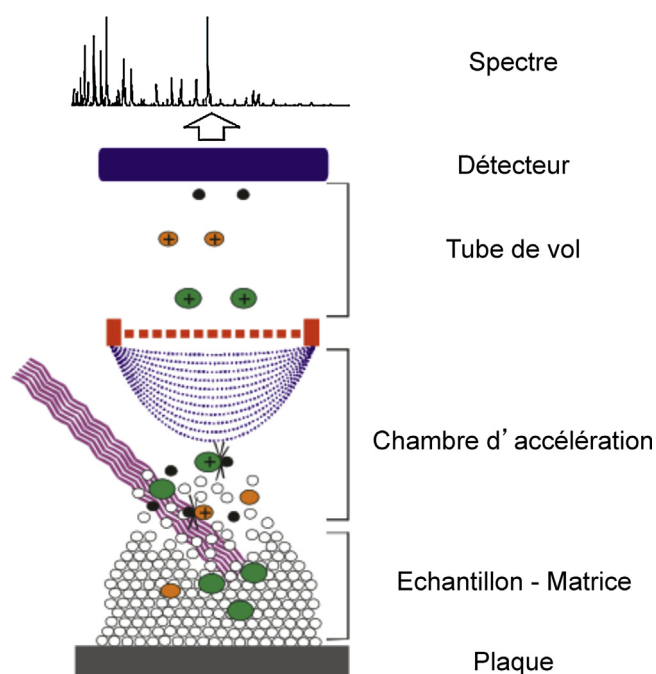


Figure 1 Schéma du spectromètre de masse et principe de la technique MALDI-TOF.

TOF fonctionne en mode linéaire où règne un vide poussé. Chaque spectre est obtenu à partir de 100 tirs [1]. Les performances des deux spectromètres sont comparables, leur résolution, capacité que présente le spectromètre de masse à distinguer des ions présentant des rapports m/z voisins mais différents, sont suffisantes pour l'identification.

Les protéines sont ionisées et séparées dans le tube à vide en fonction de leur rapport masse sur charge. Les protéines arrivent de façon séquentielle au niveau du détecteur après chaque tir dans l'ordre inversement proportionnel à leur masse. L'accumulation des enregistrements permet d'obtenir un profil qui est comparé avec les profils présents dans la base selon un algorithme propre.

Les bases

Il y a actuellement 4 bases commercialisées pour l'identification des microorganismes, chaque base fonctionne avec son propre algorithme. Les logiciels de comparaison peuvent fonctionner avec les deux types de spectromètres commercialisés en France.

Andromas®

Le logiciel Andromas® comprend trois bases de données distinctes : une base de bactéries, une base de levures et *Aspergillus* et une base pour les mycobactéries [3]. Chaque spectre contenu dans les bases a été obtenu à partir de 10 souches représentatives de l'espèce considérée, seuls les pics ayant une intensité supérieure à 7 % de l'intensité du plus haut pic ont été retenus comme significatifs. Les souches ont été cultivées dans des conditions différentes, sur des milieux différents pour augmenter la robustesse de la méthode. Les résultats d'identification sont donnés en pourcentage de similitude entre le spectre de l'échantillon et un spectre de référence de la base de données. Une « bonne identification » correspond à un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 65 % avec au moins 10 % de différence avec une autre espèce [4]. Pour certaines espèces, la distinction est difficile : *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes* de *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Escherichia coli* de *Shigella* sp., *Aeromonas veronii* de *Aeromonas caviae*, *Neisseria subflava* de *Neisseria sicca*, *Listeria monocytogenes* de *L. ivanovii innocua* par exemple.

Biotyper®

La société Bruker commercialise la base de données de spectres Maldi Biotyper DB® [5]. Cette base, marquée CE-IVD, est donc une base fermée. Certains microorganismes ont été inclus dans une base optionnelle (*Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*...).

Les résultats, issus de l'analyse par le logiciel Biotyper®, sont exprimés en log score allant de 0 à 3 correspondant à une similitude avec les spectres de la base de données allant de 0 à 100 % [5–7]. Le calcul de ce score tient compte de la concordance des pics (même rapport m/z) et de la corrélation d'intensité entre les pics similaires.

Selon les recommandations du fabricant, trois niveaux d'identification sont établis :

- un log score inférieur à 1,7 correspond à une absence d'identification ;
- un log score compris entre 1,7 et 2 correspond à une identification au niveau du genre ;
- un log score supérieur ou égal à 2 correspond à une identification au niveau de l'espèce.

Pour chaque dépôt, les deux premières propositions sont d'emblée visibles. Il est possible de visualiser les 8 autres propositions suivantes.

Cependant, certains utilisateurs retiennent des seuils différents validés par leur laboratoire pour l'identification et testés lors d'expériences. Ainsi, si un des dépôts présente une identification avec un premier log score supérieur à 2 ou supérieur à 1,7 associé à trois propositions successives identiques, le résultat est validé s'il n'y a pas de discordances avec le deuxième dépôt. L'absence d'identification ou une identification complètement improbable avec un log score inférieur à 1,6 n'est pas considérée comme une discordance mais comme une non-identification.

Saramis®

La base Saramis® est la base initialement commercialisée avec le spectromètre Axima® par la société Anagnostec (Postdam, Allemagne). Il s'agit de la base que nous utilisons dans notre laboratoire du centre hospitalier de Mulhouse [8]. Elle est actuellement commercialisée par la société Shimatzu (Axima ID Plus®) en dehors de la France et par la société BioMérieux (Vitek MS RUO®) en France. Il s'agit d'une base ouverte pouvant être utilisée en parallèle du logiciel Vitek MS Myla [9].

La base Saramis® initiale se compose de deux types de spectres différents [8,9] :

- les superspectres : ce sont des spectres globaux obtenus à partir d'au moins 15 souches différentes, toutes testées dans des conditions de cultures différentes (milieu de culture, température d'incubation). Ainsi, les superspectres contiennent les pics les plus fréquents et les plus intenses présents dans les souches d'une même espèce et permettent une identification rapide tout en minimisant l'influence des conditions de culture ;
- les spectres : il s'agit de spectres correspondant à une souche d'une espèce cultivée dans des conditions particulières. Chaque taxon est présenté par plusieurs spectres de la même souche cultivée dans des conditions différentes ou d'autres souches de la même espèce. Pour un même taxon sont donc présent des spectres de souches types de l'espèce mais également de souches atypiques de la même espèce qui sont sur-représentées. En effet, les souches représentatives d'une même espèce présentent des propriétés spécifiques tant phénotypiques, que génotypiques ou protéomiques qui les rendent atypiques mais restent des représentants d'une seule et même espèce.

Le spectre obtenu est analysé par le logiciel Saramis® qui, après comparaison avec la base de données Anagnostec, donne un résultat exprimé en pourcentage de similitude. Le spectre de la souche à identifier est comparé dans un premier temps aux superspectres, le résultat est compris entre 75 et 99,9%. En cas de similitude inférieure à 75% ou sur demande de l'opérateur, le spectre est comparé, à l'ensemble des spectres présents dans la base de données. Lorsque le pourcentage est supérieur à 50%, l'identification est considérée comme bonne, le spectre ne croisant qu'avec les spectres d'une même espèce. Une similitude comprise entre 30 et 50% doit être interprétée en fonction du nombre de propositions successives identiques. Les pourcentages inférieurs à 30% ne sont pas exploitables. Par expérience, au laboratoire de microbiologie du CH de Mulhouse, une identification est validée lorsque le pourcentage est supérieur à 40% et qu'il y a au moins 5 propositions successives identiques. Il ne doit pas y avoir de discordances entre les deux dépôts. L'absence d'identification ou une identification improbable (bactéries), avec un pourcentage inférieur à 30% et des propositions successives différentes, n'est pas considérée comme une discordance mais comme une non-identification.

Un résultat ne peut être rendu lorsque le nombre de masses est bas, c'est-à-dire que le nombre de tirs fournissant un spectre est insuffisant pour que le logiciel Saramis® puisse procéder à une analyse comparative avec la base de données. Dans ce cas, le résultat est rendu « masse insuffisante ». Ce nombre de masse est fixé par l'utilisateur et a été choisi à 50. Dans les cas où aucun tir ne fournit de spectre, le résultat est rendu *no spectrum*. La plupart du temps ces deux événements sont liés à un dépôt de mauvaise qualité ou à une quantité de microorganisme non adaptée (suspension trop riche ou trop pauvre).

Vitek MS®

Après le rachat de la base et du logiciel Saramis® à la société Anagnostec, la société BioMérieux a mis au point sa propre base avec son propre algorithme de comparaison des spectres [9].

La base Vitek MS® est une forme adaptée à partir de la base Saramis®, optimisée pour les laboratoires de microbiologie. L'algorithme a été retravaillé, l'importante souchothèque de taxons ayant servi à la validation des bases Vitek® et des galeries Api a été utilisée pour la construction de la base de données. Un protocole strict d'ajout a été validé incluant des souches cliniques. Il s'agit d'une base CE-IVD, donc fermée.

Le spectre obtenu est comparé au spectre attendu pour chaque microorganisme ou groupe de microorganismes. Un degré de confiance est calculé, il correspond au degré de similitude du spectre obtenu avec le spectre typique de chaque microorganisme. Une correspondance parfaite donne un degré de confiance de 99,9%. Quand cette correspondance n'est pas parfaite, dans le cas d'un choix unique, le degré de confiance est compris entre 60 et 99%. L'organisme est considéré non identifié par le système si le degré de confiance est inférieur à 60. Le niveau de confiance est bon si choix unique et de degré de confiance entre 60 et

99,9 ; faible discrimination si 2 choix possibles et un degré de confiance supérieur à 60 (nécessité d'autres tests pour les séparer), absence d'identité, ne correspond à aucun spectre de la base.

Préparation et dépôt des échantillons

Les matrices [9]

Différentes matrices sont commercialisées, elles permettent un éclatement des microorganismes, la libération des protéines qui migrent, réalisant une véritable chromatographie. La matrice est adaptée au laser. En fonction de la matrice, on obtiendra un spectre plus ou moins riche, favorisant l'individualisation de protéines de plages particulières de poids moléculaires.

La solution de matrice le plus souvent utilisée est l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA). Elle est saturée à 50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique. Une autre matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou DHB (eau, éthanol et acétonitrile). Les matrices sont bon marché. Leur utilisation nécessite le respect de règles d'hygiène et sécurité, l'utilisation de gants, l'acétonitrile est composant cancérigène.

Le CHCA est responsable de la formation de petits cristaux sphériques à distribution homogène. Il ne convient pas à certains taxons mais nécessite moins de tirs laser et permet l'obtention de 80 à 150 pics par spectre. Le DHB permet la formation de longs cristaux de la périphérie vers le centre du dépôt, elle convient à la majorité des taxons, mais nécessite plus de tirs laser avec obtention de 100 à 200 pics par spectre. La manipulation de cette matrice est plus délicate. Enfin, l'acide sinapique est une matrice d'utilisation plus récente. Elle permet l'analyse de protéine de plus haut poids moléculaire que le CHCA et le DHB [9].

Les dépôts

Le dépôt se fait directement à partir d'une culture fraîche du microorganisme à identifier sur des plaques en acier. Selon le spectromètre de masse, il existe des plaques de 392 puits pour le spectromètre Bruker ou 48 puits pour le spectromètre Axima® (4 plaques de 48 pouvant être analysées dans un même temps). Ces plaques sont réutilisables et doivent être nettoyées. La société BioMérieux commercialise des plaques à usage unique, jetable et identifiable par un code barre. Le microorganisme est déposé directement ou après une extraction, il est mélangé avec une matrice qui permettra une co-cristallisation en séchant.

Technique de dépôt préconisée par la société Bruker

Le « smear ». Une partie de colonie d'une culture fraîche (18 à 48 h) est déposée et étalée dans le puits en une fine couche, 1 µL de matrice est déposé, le dépôt est laissé à sécher à l'air libre [5]. Selon le fabricant ou les bases des données, il peut exister quelques variantes. Pour l'algorithme Andromas, il est recommandé de déposer 1 µL d'alcool absolu et laisser sécher avant l'ajout de la matrice [3].

Extraction par acétonitrile et acide formique [6]. Une à deux colonies sont mises en suspension dans un tube Eppendorf contenant 300 µL d'eau distillée. Neuf cent microlitre d'éthanol absolu sont rajoutés et le mélange est vortexé. Après une centrifugation de 2 minutes à $13\,000 \times g$, le surnageant est rejeté. Afin d'éliminer au maximum la solution alcoolique, le culot est à nouveau centrifugé 30 secondes à $13\,000 \times g$ et le surnageant est ôté à l'aide d'une pipette. Le culot est ensuite remis en suspension dans 50 µL d'acide formique à 70 % et 50 µL d'acétonitrile. Après un temps de contact de 15 minutes environ, entre la solution d'extraction et le culot, une dernière centrifugation de 2 minutes à $13\,000 \times g$ est réalisée. Un microlitre de la suspension d'extrait protéique est déposé sur la cible de la plaque en acier non oxydable. Après séchage à l'air libre du dépôt, 1 µL de matrice CHCA est ajouté sur la cible et le dépôt est séché à l'air libre. Cette méthode est préconisée par Bruker, notamment pour les levures.

Shimadzu-Anagnostec : dépôts et mélange de l'échantillon et extraction acide formique

Dépôt direct [1]. Une faible quantité de microorganisme est déposé dans le puits, 1 µL de matrice est immédiatement ajouté, le dépôt est mélangé par des mouvements de rotation lente. Le dépôt se dissout avec apparition de cristaux. Le mélange est arrêté avant le séchage complet du dépôt. Ce type de dépôt nécessite un entraînement.

Mini-extraction par l'acide formique [1]. Une petite quantité de microorganisme est placée dans un tube Eppendorf contenant 20 µL d'acide formique à 25 % (v/v) qui est ensuite vortexé. Après un temps de contact de quelques secondes, 1 µL de cette suspension est déposé sur une cible de la plaque. Après séchage à l'air libre, le dépôt est recouvert d'1 µL de matrice et séché à l'air libre. Dans la pratique, cette mini-extraction permet l'obtention de meilleurs dépôts. Cette étape courte permet en effet d'améliorer les résultats. Elle est utilisée essentiellement pour les bactéries à Gram positif, les levures, voire des microorganismes, pour lesquels un premier dépôt n'a pas permis l'identification, des microorganismes dont la mise en suspension dans la matrice est difficile en raison de la consistance de la colonie.

Dépôt recommandé par la société BioMérieux pour le Vitek MS [9,10]

Une partie de colonie à tester est prélevée avec une oese calibré de 1 µL et étalée en une fine couche sur le puits. Un microlitre de matrice (CHCA) est déposé au centre du puits, le mélange devant sécher complètement. Pour les levures, après avoir étalé une partie de colonie sur le puits, 0,5 µL d'une solution d'acide formique à 25 % est ajouté et après évaporation total, 1 µL de matrice est ajouté comme pour l'identification des bactéries.

Protocoles de préparations [11–13]

Les fournisseurs et les utilisateurs ont développé des techniques des dépôts particulières notamment pour l'identification des mycobactéries, des champignons filamenteux. Il s'agit de microorganismes nécessitant une technique d'extraction particulière en raison de la difficulté d'obtenir un spectre suffisamment riche. Ces techniques sont utilisées pour élaborer les spectres de référence et

doivent donc être appliquées pour l'identification des ces microorganismes en routine. Ces techniques sont propres au logiciel et la base commercialisée, à la base « maison » de l'utilisateur. Nous ne les détaillerons pas ici.

Les dépôts « calibration » et contrôle

L'utilisation du spectromètre de masse nécessite l'utilisation d'une souche de calibration et/ou de contrôle. La souche la plus souvent utilisée est une souche de référence d'*E. coli*, différente selon le fabricant. En fait, il faut distinguer les calibrations du spectromètre de masse des réajustements de la calibration qui sont effectués lors de chaque passage de plaque. Les mêmes souches sont utilisées comme contrôle en début et fin de plaque, voire au bout d'un nombre prédéfini d'identifications comme c'est le cas avec le Vitek MS® [9]. La société Bruker commercialise un mélange de protéines prédéfinies utilisé pour la calibration de son spectromètre de masse. Le BTS Bruker® contrôle contient des extraits d'*E. coli* lyophilisés, la RNase A, la myoglobine. Ces deux dernières présentent respectivement des pics à 13 683 et 16 952 m/z.

Il n'existe actuellement pas de contrôle externe spécifique en dehors des contrôles commercialisés par les laboratoires.

Bilan de l'utilisation de la spectrométrie de masse en routine

Intégration dans le laboratoire – perspective de l'accréditation – utilisation en routine [14]

Notre laboratoire effectue les analyses microbiologiques pour l'hôpital de Mulhouse ainsi que des hôpitaux proches. Le spectromètre de masse a été acquis fin mai 2009. Il s'agit d'un spectromètre Axima® couplé au logiciel Saramis® (Anagnostec), l'interconnection avec l'informatique du laboratoire se faisant via le logiciel SirWeb® de la société I2A. La programmation des plaques, la validation des identifications s'effectuent via le module Spectrométrie. Le logiciel Saramis® analyse les spectres et envoie les identifications proposées en intégrant les pourcentages de similitudes, le nombre de masse.

L'intégration de la spectrométrie de masse au sein de notre laboratoire s'est faite en plusieurs étapes. Tout d'abord un biologiste et 3 techniciennes référents ont été formés à la manipulation du spectromètre, à la technique du dépôt, à la programmation, l'interprétation et la validation des identifications dans le module spectrométrie de masse du logiciel SirWeb® ainsi que dans le logiciel Saramis®. Nous avons qualifié notre nouvelle méthode en utilisant en parallèle, pendant un mois et demi, la technique d'identification précédemment utilisée dans notre laboratoire, à savoir essentiellement l'identification par galeries Api®. En cas, de discordance, nous avons eu recours à des tests complémentaires, à des analyses de biologie moléculaire. De plus, nous avons analysé des souches de notre collection regroupant des contrôles qualité externes des 10 dernières années, des souches isolées dans notre laboratoire et identifiées par biologie moléculaire [1,8].

Secondairement l'ensemble du personnel du laboratoire a été formé à la technique de dépôt et au logiciel Sirweb®

en août et septembre 2009. Nous n'avons pas créé de poste d'identification pour que ce soit la même personne qui réalise la lecture des boîtes de cultures, le choix des colonies à étudier, le dépôt et l'antibiogramme, ainsi nous pouvions réaliser l'identification et l'antibiogramme à partir de la même colonie le plus souvent.

Un document détaillé la technique d'identification des microorganismes par spectrométrie de masse a été élaboré selon les recommandations du SH GTA 04. Pour l'accréditation le marquage CE-IVD du spectromètre de masse ainsi que du logiciel d'analyse des spectres, son algorithme, la base de données est nécessaire. Il appartient également au laboratoire de décrire et de valider la procédure adoptée en cas de non-identification par la spectrométrie de masse ou en cas d'identification de microorganismes inhabituels qu'il s'agisse de recours à des techniques conventionnelles, des techniques de biologie moléculaire ou l'utilisation d'une base autre ouverte dans laquelle sont intégrés d'autres spectres (une méthode de validation de spectres intégrés dans cette base doit être écrite et validée). La poursuite de l'identification est faite en fonction de l'importance et la signification clinique de l'isolat. Notre laboratoire doit évoluer vers la solution Vitek MS® couplée au logiciel Saramis RUO®. L'usage des plaques unique avec code barre permet de s'amender de la validation d'une procédure de nettoyage de plaques et donc de tous les contrôles nécessaires à la réutilisation des plaques de dépôts.

Des contrôles qualité internes sont à passer régulièrement pour vérifier la validité et la conformité de tout le processus d'identification. Il est également nécessaire de passer régulièrement des contrôles de qualité externe. Leur nombre et leur fréquence restent à déterminer par le laboratoire [14]. Certains recommandent l'utilisation de contrôles positif et négatif en plus des contrôles positifs commercialisés.

Identification en routine au laboratoire de microbiologie du centre hospitalier de Mulhouse [1,8,9]

Des méthodes conventionnelles d'identification ont persisté dans le laboratoire pour certains microorganismes. Même si leur identification par spectrométrie de masse est excellente, l'organisation de la paillasse fait que nous avons gardé ces méthodes classiques rapides. Par exemple, nous utilisons toujours les milieux chromogènes au poste des urines permettant l'identification directe de la majorité des isolats d'*E. coli*. Ces milieux permettent de mieux distinguer les colonies isolées. Nous avons poursuivi l'identification des *Staphylococcus aureus* par agglutination latex pour les souches isolées de pus superficiels plurimicrobiens permettant une meilleure gestion du dossier et une conclusion plus rapide. Il en est de même pour l'identification de *Candida albicans* sur milieu chromogène, quoique dans ce cas précis le recours à la spectrométrie est plus fréquent en cas du moindre doute d'identification d'une souche de *Candida dublinensis*.

Pour d'autres microorganismes, nous avons gardé la méthode classique en raison de la moindre performance de la spectrométrie de masse. En effet, pour l'identification

de *S. pneumoniae*, nous avons systématiquement recours au disque d'optochine. La spectrométrie de masse permet une bonne identification du microorganisme en superspectres ou spectre mais nécessite une quantité de bactérie importante en culture pure [1,8].

Une étude sur les 2 premières années d'utilisation a montré que 33 616 isolats sur 33 938 (99,0%) ont été identifiés à l'espèce, voire à la sous-espèce, 17 isolats ont été identifiés par séquençage de l'ARN 16S. Trois cent vingt-deux isolats (0,95%) n'ont été identifiés que partiellement au genre, une identification plus précise n'a pas été nécessaire [8]. La Fig. 2 résume la méthode d'analyse des spectres par le logiciel Saramis®.

Dans notre expérience, les entérobactéries sont très majoritairement identifiées en superspectres. Pour certaines espèces, il est parfois nécessaire de faire secondairement une comparaison en spectres, car elles sont identifiées par des superspectres correspondants à plusieurs espèces comme *Proteus vulgaris/penneri*, *Providencia stuartii/rettgeri* différenciées secondairement en spectres (concordance supérieure à 40% de 15 ou 20 spectres pour une seule espèce). Parfois, l'identification n'est pas concluante : pourcentage de similarité de 30 à 40% à plusieurs espèces différentes d'entérobactéries ; il s'agit alors le plus souvent d'espèces d'entérobactéries non présentes dans la base de données. L'utilisation du spectromètre et de la base Saramis®, les vérifications d'identification, l'utilisation de techniques simple d'identification ou le recours à l'identification par le séquençage de l'ARN 16S nous ont permis d'affiner les critères d'identification, voire de préciser les critères pour suspecter l'identification d'espèces absentes de la base (Fig. 2).

La spectrométrie de masse en routine permet une identification rapide des microorganismes fastidieux à l'espèce du genre *Capnocytophaga*, *Bordetella*, de microorganismes hautement pathogènes en réduisant leur manipulation comme *Brucella* sp., *Francisella tularensis*... L'identification des bactéries anaérobies est également facilitée. *Clostridium difficile* est identifié sans équivoque ; la base contient un grand nombre de taxons anaérobies. L'identification des staphylocoques est particulièrement concluante et la spectrométrie beaucoup plus performante que les techniques conventionnelles comme nous avons pu le montrer lors d'une étude organisée sur les centres du Collège bactériologie virologie hygiène des hôpitaux non universitaire. Notre base a pu être enrichie de spectres « maison » (*S. pettenkoferi*, *S. condimentii*). Les streptocoques pyogènes sont parfaitement identifiés en spectrométrie. En ce qui concerne les streptocoques oraux, selon l'espèce l'identification est plus ou moins performante. Nous avons utilisé des critères de validation plus stricts. Pour certains streptocoques oraux (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. constellatus*), et les entérocoques, l'identification se fait le plus souvent en superspectres. Pour les autres espèces de streptocoques oraux, l'identification se fait initialement en superspectres *Streptococcus* sp. ou groupes de streptocoques oraux (*mitis/oralis*...), la comparaison en spectres étant discriminante en seconde intention. Nous appliquons alors des règles d'interprétation strictes, avec la nécessité d'avoir plusieurs fois la même espèce (5 à 10) avec des pourcentages de similarité supérieurs à 50% ; ainsi, l'identification

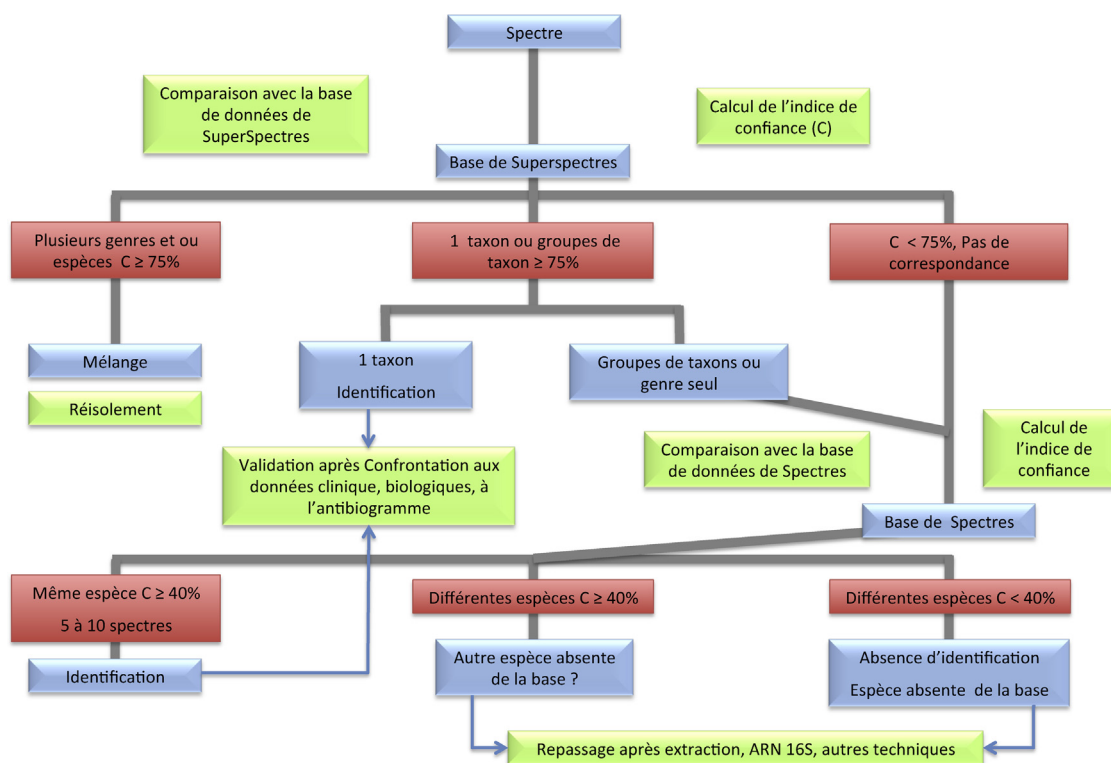


Figure 2 Schéma d'interprétation par le logiciel Saramis® des spectres obtenus sur Axima®. Validation de l'identification après confrontation aux données cliniques et aux résultats de l'antibiogramme, voire d'examen complémentaires, détection des taxons absents de la base. Le pourcentage de confiance est variable en fonction des groupes bactériens. Pour les espèces du genre *Streptococcus*, il est de 50 % minimum.

peut aller jusqu'à la sous-espèce et permet une très bonne identification de *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*... L'identification des corynebactéries est peu satisfaisante avec la base Saramis actuelle, seules 7 espèces sont présentes dans la base.

L'identification des levures par les techniques conventionnelles reste fastidieuse. Un travail réalisé conjointement entre l'institut de parasitologie de Strasbourg et le laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Mulhouse par Lohmann et al. [15] a permis de montrer que la performance du BiFlex® III couplé au logiciel Biotyper® et l'Axima® couplé au logiciel Saramis® étaient comparables. Pour le MALDI-TOF Bruker, 261 souches (84,5%) ont été bien identifiées, mais 38 souches (12,3%) n'ont pas donné de résultats interprétables (20 absences d'identification et 18 avec log-score insuffisant) et une identification erronée a été proposée pour 10 souches (3,2%) (8 *C. inconspicua* et 2 *T. asahii*). Pour l'Axima®-Saramis®, 255 souches (82,5%) ont été bien identifiées, mais 51 souches (16,5%) n'ont pas donné de résultats interprétables (43 absences d'identification et 8 pourcentages de concordance trop faible) et une identification erronée a été proposée pour 3 souches (1%) (2 *C. guillermundii* et 1 *T. asahii*). Les résultats avec un score ou un pourcentage insuffisant ou les résultats sans identification étaient quasiment toujours liés à l'absence ou à la faible représentation de l'espèce dans la base de données. Celles-ci doivent être encore développées. L'enrichissement des bases est très prometteur.

Dans la littérature

Les premières études [1,5,6,12,16,17] concernant la performance dans l'identification bactérienne en pratique de routine ont montré que la spectrométrie est une technique rapide, fiable et rentable pouvant remplacer et/ou compléter les techniques conventionnelles d'identification phénotypique pour la plupart des souches bactériennes isolées dans les laboratoires de microbiologie clinique. Pour les isolats bactériens de routine, l'identification par MALDI-TOF MS au niveau de l'espèce a été obtenue dans 84,1 à 93,6% des cas. Une extraction améliore les scores d'identification.

La concordance entre l'identification en spectrométrie de masse et les techniques conventionnelles d'identification sont de 84% à 95% [18], les limites de la spectrométrie de masse sont :

- la résolution des spectromètres de masse apparaît insuffisant pour certains genres bactériens ou espèces particulières comme les streptocoques oraux, le pneumocoques. L'étude de la littérature montre que certains spectromètres couplés à leur logiciel permettent des meilleurs résultats. Les résultats sont variables en fonction des bases de données et de l'algorithme ;
- quel que soit le spectromètre, la distinction entre *E. coli* et *Shigella* sp. est impossible ;
- une mauvaise identification peut être due à un spectre de référence incorrect ou à des changements de la taxonomie qui n'ont pas été pris en compte ;

- un nombre insuffisant de spectres dans la base peu également être à l'origine de l'absence d'identification. Les souches de référence ne représentent pas toute la diversité d'une espèce donnée, les pics ne sont pas tous représentatifs de l'espèce [15,19];
- certains microorganismes de part la composition de leur paroi nécessitent des protocoles de préparation particulière des dépôts. Les résultats sont alors très intéressants comme l'ont montré Erhard et al. [20] pour *Trychophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* et *Arthroderma benhamiae*, identifiés en superspectres avec des pourcentages de confiance de 99,9%. La difficulté de l'identification des champignons filamenteux réside essentiellement dans la variété d'expression de ces microorganismes : présence ou non de basidiospore, de formes végétatives ou non correspondant à différents âges ou stades de développement. Ces variations affectent la reproductibilité des spectres obtenus. Il existe différents protocoles de préparation des dépôts variant d'un spectromètre et du logiciel utilisé, voire de l'utilisateur pour un même algorithme. Les spectres de référence doivent tenir compte de cette variabilité, donc inclure différents spectres ou groupes de spectres représentatifs de ces différentes formes pour une même espèce [21].

Martini et al. ont comparé les performances du Microflex®, du Vitek MS® et de l'Axima® Saramis® sur un collectif de plus de mille souches [22]. Les 2 premiers systèmes ont une efficacité comparable en routine avec respectivement l'identification de 92,7% et 93,2% des isolats de routine ($n = 986$). Le système Vitek MS® est plus performant pour l'identification des streptocoques oraux, des *Salmonella typhi*; pour le genre *Bacteroides* mais moins pour le genre *Fusobacterium*. Aucun système n'est plus performant pour distinguer *E. coli* de *Shigella* sp. Dans cette étude, la base Saramis® est moins performante que les deux autres bases. Marko et al. [23] ont comparé les systèmes Biotyper® et Vitek MS® sur une collection de 200 bacilles Gram négatif non fermentants les résultats sont plus performants pour l'identification au genre pour Microflex Biotyper® que pour Vitek MS® mais le plus souvent qu'après une étape d'extraction. L'identification à l'espèce est comparable. Cette étude a été réalisée avec la première version de la base Vitek MS®.

Coût, maintenance

Bill et al. ont montré que l'identification MALDI-TOF est cinq fois moins chère que l'identification par des galeries biochimiques, cette étude de coût incluant le coût de l'instrument, son entretien, l'identification [3]. D'après les mêmes auteurs, une utilisation raisonnée de la spectrométrie de masse, permet une identification très rapide (< 10 min (bactéries et champignons), 20 min (mycobactéries) et 15 min (hémocultures)), peu coûteuse et efficace de tous les microorganismes isolés en routine quel que soit le milieu de culture utilisé. Les bons résultats ont été obtenus malgré le grand nombre de techniciens qui ont utilisé cette méthode.

L'investissement pour l'achat du spectromètre de masse est important (à partir de 150 000 euro), les consommables

sont réduits comparativement à l'utilisation des techniques conventionnelles (galeries Api®, carte d'identification Vitek® ou autres). L'acquisition d'un spectromètre de masse est « rentable » à condition d'avoir au moins entre 40 à 50 identifications quotidiennes. Les seuls consommables sont l'achat de la matrice et éventuellement des plaques à usage unique. En revanche, le coût de la maintenance est particulièrement élevé comparativement à un automate d'identification classique. Le contrat de maintenance, indispensable, permet des interventions minimales comme le réajustement du laser, cette technologie nécessite des réglages fins qui peuvent être réalisés en télémaintenance. Ces réglages sont nécessaires pour garantir les performances de l'appareil mais également afin d'améliorer la longévité des différents composants et plus particulièrement du laser. Une visite annuelle est suffisante, elle nécessite d'avoir un back-up, voire un autre utilisateur proche. Il est parfois nécessaire de changer certaines pièces : le détecteur, les pompes à vide, le laser. Les sociétés proposent différents contrats incluant plus ou moins d'option allant jusqu'au changement de laser...

Limites et difficultés rencontrées lors de l'utilisation de la spectrométrie de masse

Les spectromètres de masse sont des appareils sensibles aux variations de température, aux vibrations, à l'empoussièrement. Les fabricants indiquent, le plus souvent des limites de température d'utilisation ainsi que des variations sur un temps donné. Une maintenance ou un suivi insuffisant du spectromètre peuvent être responsables d'une moindre performance de l'identification. On s'aperçoit, par exemple, que globalement le pourcentage de bonnes identifications en superspectres au premier dépôt diminue ou dans le cas de l'Axima®-Saramis®.

Lors du processus d'identification, plusieurs types de problèmes peuvent survenir et aboutir à une identification erronée. Lorsque la bactérie est encapsulée, le dépôt peut être difficile ou l'extraction des protéines est difficile, réduite. Il peut également s'agir d'une non observance du protocole d'extraction, de l'utilisation de réactifs défectueux (problèmes de péremption, de dégradation, de mauvaise conservation). Il faut donc exiger des protocoles d'extraction rigoureux, reproductibles et spécifiques en fonction du microorganisme à identifier. Il faut également s'assurer d'un programme qualité adéquat. L'étape d'extraction peut être contrôlée en testant régulièrement quelques souches bactériennes idéalement sélectionnées. Croxato et al. [12] proposent la mise en place des contrôles de qualité interne qui testent l'étape d'extraction sur 2 espèces différentes (une souche d'*E. coli* et une souche de *Staphylococcus aureus*) avec étude de la reproductibilité, passage des souches régulièrement, vérification de la présence de pics constants et contrôle de l'intensité des pics observés.

La réutilisation des plaques de dépôt nécessite un nettoyage méticuleux afin d'éviter tout risque d'erreur. L'utilisation de plaque jetable permet de s'amender de ces possibilités d'erreur et de validation d'une méthode de lavage des plaques et des contrôles d'efficacité qui en découlent.

L'acquisition de la technique de dépôts est rapide, mais demande une certaine reproductibilité. Nous avons observé parfois une dérive dans la façon de déposer. Il y a également une possibilité d'inversion des dépôts, des plaques dans le spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse connaît ses propres limites actuellement : l'identification des microorganismes non cultivables, des analyses des échantillons plurimicrobiens surtout si une espèce est prédominante par rapport aux autres présentes... [24]. Certaines limites pourront probablement être surmontées grâce à nouvelles avancées dans la technologie de préparation de l'échantillon.

La non-identification peut être dû à l'absence du taxon dans la base de données. Dans le cas de l'utilisation de l'Axima®-Saramis®, il s'agit de souche pour lesquelles le spectre obtenu croise avec des taxons différents à des pourcentages de similarité inférieurs à 30–40% selon les taxons. Il faut alors avoir recours à d'autres techniques d'identification allant des méthodes conventionnelles comme les galeries Api à la biologie moléculaire par séquençage de l'ARN S16. Le [Tableau 1](#) présente quelques exemples de souches non identifiées par la spectrométrie de masse et pour lesquelles a été réalisé une identification par séquençage de l'ARN 16S [19]. Les souches ont été expédiées au laboratoire GenoScreen (Lille) pour séquençage et interprétation. Le séquençage a permis l'identification à l'espèce de souches absentes de la base ou peu présentes (moins de 5 spectres). Il ne permet parfois l'identification qu'à l'espèce (*Paracoccus* spp., *Cytophaga* spp.). Dans la moitié des cas, le séquençage ne nous a pas permis d'avoir une identification précise. Pour certaines de ces souches, il pourrait s'agir d'espèces non encore décrites, des études complémentaires sont en cours.

Après avoir vérifié l'absence du taxon dans la base ou sa faible représentation, en général inférieur à 5, il est alors possible d'introduire le nouveau taxon dans la base. Le protocole d'ajout doit être strict afin d'éviter toute erreur, il faut vérifier l'absence de croisement avec d'autres spectres ou superspectres.

Autres applications de la spectrométrie de masse

Détermination des résistances aux antibiotiques

Dans une revue récente, Hrabak et al. font le bilan de l'apport de la spectrométrie de masse dans l'étude de la détection de la résistance des bactéries aux antibiotiques [25]. Plusieurs types d'approches ont été développés : la détection des modifications de l'antibiotique par des enzymes de dégradation ; la détection des mécanismes déterminants de la résistance à travers des études protéomiques de bactéries multirésistantes ; la modification des cibles des antibiotiques comme la méthylation des protéines ribosomales, enfin la quantification de l'antibiotique pour les mécanismes d'influx et d'efflux. Majoritairement, ces techniques sont pour l'instant réservées à des laboratoires de recherche. Nous nous sommes intéressés aux techniques utilisables en routine par les laboratoires de bactériologie. Les premières études ont visé à mettre en évidence les carbapénémases. Dans ce cas, il s'agit d'analyser l'antibiotique

et ses produits de dégradation par la carbapénémase. La technique est simple. Une suspension à 3 McFarland de la bactérie est incubée pendant 2 heures avec un carbapénème, puis centrifugée. Le surnageant est ensuite analysé en spectrométrie. Cette méthode peut être faite par des laboratoires de routine mais nécessite une certaine compétence pour lire les spectres. La détection d'autres activités enzymatiques est en cours d'étude et réservée à des laboratoires spécialisés. La détection des entérocoques résistants à la vancomycine a été validée pour *Enterococcus faecium* type *vanA* sur analyse des extraits bactériens. Enfin, l'analyse des produits de PCR pour la mise en évidence de bêta-lactamase à spectre élargie est possible, mais la technique ne permet pas d'augmenter la rapidité de réponse. La méthode reste fastidieuse et réservée à des laboratoires très spécialisés [25].

Dans leur revue, Hrabak et al. insistent sur la puissance de la technique MALDI-TOF mais également son utilisation prudente [25]. Les approches protéomiques dans les études des souches résistantes doivent être complétées par des techniques de génétique moléculaire. La technique MALDI-TOF permet de détecter l'activité biologique des enzymes responsables de la modification de molécules antibiotiques, ce qui n'est pas possible avec les techniques génétiques. Les résultats présentés montrent que la spectrométrie est un outil utile pour la détection de la résistance aux antibiotiques et qu'elle ouvre de nouvelles voies à la fois cliniques et expérimentales en microbiologie. Nous ne croyons pas, cependant, que l'application de cette technique pourra remplacer les tests de sensibilité standard, la résistance aux antibiotiques étant un processus complexe.

Identification dans les prélèvements

Messaoui et al. [26] ont testé un protocole d'identification bactérienne à partir de flacons d'hémoculture en utilisant des tubes de prélèvement avec des gels de séparation suivi d'une extraction des protéines bactériennes (durée de préparation 80 minutes). Les échantillons ont été étudiés sur Biflex III® et le logiciel Biotyper 2,0®. Cent quatre-vingt-treize des 213 bactéries Gram-négatives (91,08%) et 284 de 319 bactéries Gram positives (89,02%) ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce. En cas d'échantillons polymicrobiens, l'une des espèces présentes a été identifiée (80,9%). Des erreurs d'identification ont été constatées pour des isolats identifiés comme *S. pneumoniae*, alors qu'il s'agissait de *S. mitis*. Selon Drancourt [27], un inoculum de 10⁷/mL est nécessaire pour une bonne identification en 2 heures.

Fothergill et al. ont étudié l'identification sur Vitek MS® [28]. Les aliquots prélevés sur 259 flacons positifs d'hémoculture ont été lysés pendant 2 à 4 minutes puis filtrés sur membrane. L'analyse a été réalisée sur Vitek MS®. Une identification correcte a été obtenue pour 73% des cultures, 19,7% n'ont donné aucune identification, 2,3% ont donné une identification erronée. Les flacons ne contenant pas de charbon, aucune centrifugation n'a été nécessaire permettant une identification en moins de 15 minutes.

Nous effectuons ponctuellement l'identification directement sur flacons positifs d'hémoculture (nous utilisons le

Tableau 1 Exemples des quelques souches non identifiées à l'espèce par la spectrométrie de masse et étudiées par séquençage de l'ARN 16S.

Identification MALDI-TOF	Identification 16S	Similarité (%)	Base Saramis®	Nombre d'espèce pour le genre dans la base	Apport S16
Entérobactérie	<i>Cronobacter turicensis</i>	100	Espèce absente	1	Oui
Entérobactérie	<i>Serratia fonticola</i>	99	Espèce absente	9	Oui
Entérobactérie	<i>Enterobacter cowanii</i>	99	Espèce absente	8	Oui
Entérobactérie	<i>Enterobacter</i> sp.	99	Genre présent	8	Nouvelle espèce ?
Entérobactérie	<i>Pantoea agglomerans</i> et <i>E. asburiae</i>	99	6 superspectres, 101 spectres, 2 superspectres, 49 spectres	8	?
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	99	Espèce absente	40	Oui
Non	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	99	3 spectres	1	Oui
Non	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	99	Espèce absente	6	Oui
Non	<i>Bordetella hinzi</i>	100	Espèce absente	8	Oui
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	99	Genre présent	9	Nouvelle espèce ?
<i>Campylobacter</i> sp.	<i>Campylobacter</i> sp.	99	Genre présent	9	Nouvelle espèce

système Bactec Fx® de BD) [9]. Un millilitre est prélevé sur le flacon, centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est jeté, le culot est remis en suspension dans 1 mL d'eau distillée. Le tube est à nouveau centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. Enfin le culot est remis en suspension dans 1 mL de tampon Tris EDTA, centrifugé 10 min. Le culot est remis en suspension dans un volume de 20 à 50 µL d'acide formique à 25 % (v/v), 1 µL est déposé sur la plaque de dépôt avec ajout, après évaporation, de 1 µL de matrice. Nous n'utilisons pas cette méthode en routine, en effet, la technique permet une identification en 45 minutes extraction comprise et ne peut être réalisée au coup par coup. Cette méthode est très satisfaisante pour les hémocultures à cocci et bacilles Gram négatif ainsi que sur flacons anaérobie (le gain pouvant être de plus de 48 h).

Le milieu de culture des flacons d'hémoculture est une solution complexe contenant des protéines non bactériennes du sang du patient et des milieux de croissance nutritifs [29]. Ces protéines parasites le spectre obtenu. Les protocoles de préparation du culot bactérien à partir d'un flacon hémoculture positive sont nombreux, plus ou moins longs. Ils ont pour but l'élimination des cellules sanguines essentiellement par lyse de ces cellules, un lavage pour se débarrasser des protéines « parasites » avant extraction douce des protéines bactériennes par la matrice.

Dans toutes les études, les résultats les moins intéressants sont obtenus avec les bactéries à Gram positif, et notamment les streptocoques du groupe mitis/oralis. Les mélanges donnent également de mauvais résultats ou seule la bactérie prédominante est identifiée mais il peut également y avoir une mauvaise identification à l'espèce. Le protocole optimal pour le traitement des flacons d'hémoculture reste à déterminer et à évaluer ; plusieurs protocoles ont été publiés, différents en fonction du spectromètre utilisé, des fournisseurs des flacons d'hémocultures [26–29]. Une méthode standardisée ouvrira la voie à une automatisation. Se pose également le problème

de l'intégration de la technique dans le flux de travail du laboratoire (positivité des flacons au fil de l'eau).

Pour l'identification directement sur prélèvement urinaire, un pré-traitement est également nécessaire. Ferreira et al. [30] ont proposé une double centrifugation : une première étape de centrifugation à faible vitesse pour éliminer les leucocytes, puis une deuxième étape de centrifugation à grande vitesse pour recueillir les bactéries, permettant ainsi une identification de 94,2 % des bactéries, il faut pour cela des concentrations très élevées en bactéries. Il semble que le MALDI-TOF sur l'urine n'est pas rentable et pas assez efficace pour être mis en œuvre directement sur des échantillons d'urine. En effet, comme la plupart des isolats urinaires sont *E. coli* (> 80 % chez les cystite survenant chez les jeunes femmes et environ 50 % des infections urinaires compliquées). La culture reste de toute façon obligatoire pour la réalisation de l'antibiogramme à partir de colonies isolées.

Conclusions

Les applications futures de la technique MALDI-TOF en microbiologie dépendront de l'expansion des bases de données actuelles ainsi que dans les domaines de la médecine vétérinaire, de la pathologie végétale, de la sécurité alimentaire, de la microbiologie industrielle, de la production d'eau potable, de la pharmacologie... Pour réaliser des identifications fiables des microorganismes dans ces domaines, les espèces et les souches de référence pertinentes doivent être choisies et incluses dans les bases de données. Outre la base de données, les progrès technologiques permettront une automatisation du dépôt, une réduction au minimum de l'échantillon requis. Ils permettront d'améliorer non seulement la vitesse d'acquisition des données, mais également la qualité des spectres de masse et, par conséquent, le contenu de l'information de l'empreinte de masse. Ainsi

se développeront les applications futures de MALDI-TOF MS en microbiologie : études épidémiologiques des souches, études des facteurs de virulence. . .

Une base de données complète et représentative est une condition essentielle pour une identification précise des isolats par spectrométrie. Une mise à jour fréquente de cette base avec des spectres de souches de référence, des souches isolées dans des laboratoires de diagnostic de routine peut avoir une incidence significative sur les performances d'identification MALDI-TOF. Les bases doivent tenir compte de l'évolution de la taxonomie. Tout taxon inclus dans la base doit être comparé aux autres taxons déjà présents afin d'éviter les confusions et garder la capacité de distinction entre 2 taxons donnés.

La méthode est performante et est utilisable en routine par les laboratoires d'analyses médicales et permet l'identification des microorganismes au genre, l'espèce, voire dans certains cas à la sous-espèce. Les protocoles de préparation ou d'extraction doivent être standardisés, la confection des bases est extrêmement rigoureuse [31]. Les perspectives sont nombreuses : détection des résistances, étude épidémiologique des souches. . . La spectrométrie de masse est un outil puissant de diagnostic microbiologique en routine. En quelques années, la spectrométrie a complètement révolutionné la microbiologie [32]. Il faut veiller à ce que la simplicité de la méthode n'entraîne pas un appauvrissement des connaissances en microbiologie systématique, il faut entretenir l'expertise microbiologique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Gravet A. Spectrométrie de masse et identification bactérienne, l'expérience du laboratoire de microbiologie du CH de Mulhouse. *Spectra Biol* 2010;180:45–50.
- [2] Menet C. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Fr Lab* 2011;437:41–53.
- [3] Bille E, Dauphin B, Leto J, Bournoux ME, Beretti JL, Lotz A, et al. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(11):1117–25.
- [4] Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol* 2012;50(8):2702–7.
- [5] Ross A, Carricajo A. Utilisation en routine du système d'identification bactérienne par spectrométrie de masse par Maldi-Tof. *Spectra Biol* 2011;188:34–40.
- [6] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010;48:1169–75.
- [7] Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE* 2011;6(1):e16424.
- [8] Gravet A, Camdessouens-Miehé G, Gessier M, Peluso A-R, Vogelsperger-Fuchs B, Lohmann C, et al. Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie. *Pathol Biol* 2010;59:19–25.
- [9] Gravet A. Camdessouens-Miehé. Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. *Rev Fr Lab* 2011;437:55–64.
- [10] Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2012;50(8):2568–76.
- [11] Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods* 2013;92(1):14–24.
- [12] Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(2):380–407.
- [13] Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Ishii C, Miyabe A, et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem* 2011;400(7):1905–11.
- [14] Comité Qualité (QUAMIC) de la Société française de microbiologie – Recommandation 2013. Identification bactérienne par spectrométrie de masse. Paris, France; 2013. p. 91–6.
- [15] Lohmann C, Sabou M, Moussaoui W, Prevost G, Delarbre JM, Candolfi E, et al. Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for yeast identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51(4):1231–6.
- [16] Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(11):1614–9.
- [17] Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(11):1604–13.
- [18] Carbonnelle E, Greub G, Villa J. MALDI-TOF in microbiology. In: *European Manual of Clinical Microbiology*. 1st ed. SFM, ESCMID; 2012. p. 31–5.
- [19] Camdessouens-Miehé G, Lohmann C, Delarbre JM, Schmitt F, Gravet A. Spectrométrie de masse et séquençage de l'ARN 16S. 9^e Congrès de la Société française de microbiologie. Lille, France. 2013.
- [20] Erhard M, Hipler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wöstemeyer J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol* 2008;17(4):356–61.
- [21] Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(5):750–5.
- [22] Jamal WY, Shahin M, Rotimi VO. Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *J Med Microbiol* 2013;62(Pt 4):540–4.
- [23] Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1313–25.
- [24] Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, Hyman J, Walsh J, Arbefeville S, et al. Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting

- gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2012;50(6):2034–9.
- [25] Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol* 2011;34(1):2–11.
- [26] Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(1):103–14.
- [27] Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:1631–8.
- [28] Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(11):1620–5.
- [29] Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, Walsh J, Drake T, Wang YF. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. *J Clin Microbiol* 2013;51(3):805–9.
- [30] Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48(6):2110–5.
- [31] Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 2012;15(3):397–402.
- [32] van Belkum A, Welker M, Erhard M, Chatellier S. Biomedical mass spectrometry in today's and tomorrow's clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012;50(5):1513–7.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Maladie de Fabry : aspects clinique, biologique et thérapeutique

Fabry Diseases: Clinical, biological and therapeutic aspects

C. Henda^{a,*}, G. Nerjes^a, M. Adnen^b, F. Selima^a, M. Abdelhedi^a

^a Laboratoire de biochimie, CHU Farhat Hached Sousse, Sousse, Tunisie

^b Service de pédiatrie, CHU Farhat Hached Sousse, Sousse, Tunisie

Reçu le 28 mars 2013 ; accepté le 7 avril 2013

KEYWORDS

Fabry disease;
 α -galactosidase A;
 GLA gene;
 Globotriaosylceramide;
 Organ failure;
 Enzyme replacement
 therapy

MOTS CLÉS

Maladie de Fabry ;
 α -galactosidase A ;
 Gène GLA ;
 Globotriaosylcéramide ;
 Surcharge
 multiviscérale ;
 Enzymothérapie
 substitutive

Summary Fabry disease is an X-linked inborn error of glycosphingolipid catabolism due to a deficiency of lysosomal α -galactosidase A (α -Gal A). This deficiency leads to progressive and ubiquitous accumulation of globotriaosylceramide (Gb3) in different tissues. In classic form, the disease is most severe in hemizygous males with early clinical signs predominated by acroparesthesia and angiokeratomas. Subsequently, accumulation of Gb3 in small vessels of organs causes organ failure. Heterozygous females are often symptomatic and severity of symptoms depends of random X chromosome inactivation. In males, the diagnosing is confirmed by the demonstration of deficient α -Gal A enzyme activity in plasma, isolated leukocytes, and/or cultured cells. Molecular genetic testing is the most reliable method for the diagnosis of carrier females. Before the advents of enzyme replacement therapy (ERT), treatment for Fabry disease consisted of symptomatic management.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé La maladie de Fabry (MF) est une erreur innée du catabolisme des glycosphingolipides, liée à l'X. Cette sphingolipidose est due à un déficit en une enzyme lysosomale, l' α -galactosidase A (α -Gal A). Ce déficit entraîne l'accumulation progressive et ubiquitaire dans différents tissus des globotriaosylcéramide (Gb3). Dans sa forme classique, l'affection touche plus sévèrement les hommes hémizygotés avec des signes cliniques précoces prédominés par des acroparesthésies et des angiokératomes. Par la suite, l'accumulation progressive des Gb3 dans la microvascularisation des organes entraîne une défaillance multiviscérale (rénale, cardiaque et cérébrale). Les femmes hétérozygotes sont souvent symptomatiques et la sévérité des symptômes dépend de l'inactivation au hasard d'un chromosome X. Le diagnostic de la maladie est confirmé par la détermination de l'activité enzymatique pour les hommes et la recherche de la mutation du gène GLA pour les femmes. Le traitement de la MF est basé sur une prise en charge symptomatique mais l'enzymothérapie substitutive reste la meilleure alternative.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : chahedhind@yahoo.fr (C. Henda).

Introduction

La maladie de Fabry (MF, OMIM # 301500) était décrite pour la première fois par les dermatologues William Anderson et Johannes Fabry en 1898 [1,2].

C'est une erreur innée du catabolisme des glycosphingolipides, liée à l'X. Cette sphingolipidose est due à un déficit en une enzyme lysosomale, l' α -galactosidase A (α -Gal A, α -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.22). Ce défaut enzymatique conduit à l'accumulation progressive et ubiquitaire dans différents tissus des glycosphingolipides non dégradés, essentiellement, le globotriaosylcéramide (Gb3) connu également sous le nom de céramide trihexoside ou CTH (gal-gal-glu-céramide) (Fig. 1) [3].

La MF est une maladie pléomorphe, dans sa forme classique l'affection touche les hémizygotés et la maladie évolue en trois périodes, une phase précoce débutant dans l'enfance (dominée par des acroparesthésies et des angio-kératomes), une phase quiescente qui concerne les adultes âgés de 20 à 30 marquée par l'atténuation des acroparesthésies mais l'apparition d'une protéinurie. Par la suite (vers la troisième et la quatrième décennie), l'accumulation progressive des Gb3 dans la microvascularisation des organes entraîne une défaillance multiviscérale (insuffisance rénale, et complications ischémiques cardiaque ou cérébrale) et réduit l'espérance de vie [4]. Certains patients peuvent avoir une forme atypique ou à début tardif à prédominance cardiaque ou rénale. Les femmes hétérozygotes sont souvent symptomatiques et la sévérité des symptômes dépend de l'inactivation au hasard d'un chromosome X [5].

La MF est pan-ethnique et les incidences rapportées varient de 1/40 000 à 1/117 000 dans la population générale, mais les prévalence réelles semblent plus élevées [4–6]. Le dépistage néonatal systématique a révélé une prévalence étonnamment élevée de la maladie. Ainsi en Italie, la fréquence est d'un sur 3100 nouveau-nés [7] et à Taiwan, la fréquence est d'un sur 1500 nouveau-nés garçon [8]. En Tunisie, il n'y a pas d'enquête épidémiologique sur la MF.

L' α -galactosidase A

L' α -Gal A (α -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.22) est une enzyme lysosomale d'environ 101 kDa. Cette enzyme est un homodimère, chaque monomère est constitué de 398 acides aminés et possède un site actif. Les deux résidus d'acide aspartique en position 170 et 231 constituent le site catalytique qui permet de libérer l' α -galactose du substrat de l'enzyme [9,10].

Cette enzyme est synthétisée sous la forme d'un pré-curseur polypeptidique de 429 acides aminés, dont les

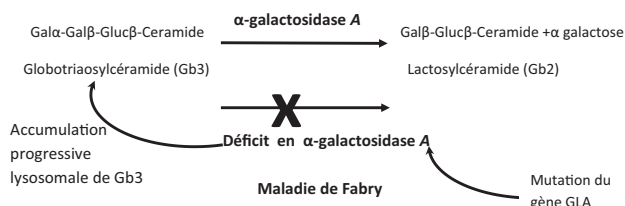


Figure 1 Catabolisme du globotriaosylcéramide et déficit enzymatique responsable de la maladie de Fabry.

31 premiers constituent le peptide signal qui est clivé dans le réticulum endoplasmique. L' α -Gal A ainsi synthétisée va subir des modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi. Au niveau du compartiment cis-golgi, la N-glycosylation de l'enzyme permet l'acquisition des résidus mannose-6-phosphate (M6P). Le complexe M6P-enzyme se lie au récepteur M6P, cette liaison permet le transport de l'enzyme vers l'endosome. À ce niveau, le pH acide permet de dissocier l'enzyme du récepteur M6P. En suite, la déphosphorylation de l'enzyme permet d'obtenir une enzyme mature et fonctionnelle [11].

En utilisant des méthodes d'hybridation moléculaire le gène (GLA) codant pour l'enzyme a été localisé sur le chromosome X (Xq22). Il a une taille d'environ 12 kb et comprend sept exons. L'ADNc de 1290 pb code pour une protéine de 429 acides aminés incluant à son extrémité N-terminale un peptide signal de 31 acides aminés et elle a la particularité de ne pas posséder de région 3' non traduite [12]. Plus de 585 mutations hétérogènes ont été enregistrées (dont 435 référencées sur le site Human Gene Mutation Database [HGMD]) [13–15] dont 57 % de mutation sont de type faux-sens où les patients peuvent avoir une activité enzymatique résiduelle, allant de 2 à 25 % [16].

Les études d'activité résiduelle GLA des formes mutantes de l'enzyme ont révélé que la majorité avait des propriétés cinétiques similaires à l'enzyme sauvage, mais elles étaient beaucoup moins stables [17,18]. Ces résultats suggèrent que le déficit enzymatique observé chez ces patients Fabry est due à un mauvais repliement de la protéine et/ou à un défaut de transport de l'enzyme vers les lysosomes. Très probablement, la protéine mutante est retenue dans le réticulum endoplasmique et où elle est dégradée. Par conséquent, la découverte de petites molécules appelées chaperonne peuvent aider le repliement des enzymes mutantes, prévenir une dégradation prématurée et donc augmenter la quantité d'enzyme active dans les lysosomes [19].

Physiopathologie

Dans la MF, le déficit en α -Gal A conduit à l'accumulation progressive de glycosphingolipides neutres à résidus α -galactosyl terminaux (le globotriaosylcéramide ou CTH ou Gb3 ou GL3) dans la plupart des tissus et des liquides biologiques. Les plus fortes concentrations en Gb3 ont été trouvées dans le rein, les ganglions du système nerveux autonome, mais également dans le cœur, la rate, l'intestin, le foie, les poumons, les amygdales, le muscle lisse, le foie fœtal et le plasma [20,21].

Au niveau cellulaire, l'accumulation lysosomale de Gb3 entraîne premièrement une perturbation du métabolisme énergétique, un dysfonctionnement du canal $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ des cellules endothéliales et un stress oxydatif responsables d'une ischémie puis d'une mort cellulaire, secondairement, le processus inflammatoire qui s'installe serait responsable des lésions vasculaires, d'une perturbation de la maturation d'autophagocytose et d'une fibrose tissulaire irréversible [22–24].

Cette surcharge lipidique touche particulièrement : les cellules endothéliales, les cellules épithéliales de la cornée, des glomérules et des tubules rénaux (responsable

de la protéinurie et de l'insuffisance rénale), les cellules musculaires lisses telles que les myocytes et en particulier les cardiomyocytes (cardiomyopathie), les glandes sudoripares (anomalies de la sudation), les fibres des muscles piloérecteurs et les neurones ganglionnaires digestifs, des astrocytes et des cellules méningées.

Description clinique

Hommes hémizygotés Fabry

Forme classique

La forme classique de l'affection débute dans l'enfance (entre trois et dix ans) avec des signes précoces important à connaître lorsque l'on considère que le délai entre le premier symptôme et le diagnostic est en moyenne de plus de 15 ans chez l'homme et chez la femme.

Les signes précoces comprennent :

- des crises douloureuses à type d'acroparesthésies : il s'agit d'une douleur très vive des extrémités distales commençant le plus souvent à l'enfance ou au début de l'adolescence. Ces accès durent entre quelques minutes et plusieurs jours et sont habituellement déclenchés par l'exercice, la fatigue, une émotion ou des variations rapides de température et d'humidité [25,26]. Les acroparesthésies résultent probablement du dépôt de Gb3 dans les petits vaisseaux qui irriguent les cellules nerveuses périphériques. L'accumulation endothéliale de Gb3 rétrécit la lumière vasculaire et provoque des spasmes du vaisseau ou l'apparition d'infarctus qui déclenchent des douleurs très vives [27] ;
- des angiokératomes : sont des maculopapules rouges foncées parfois hyperkératosiques. L'ombilic, les flancs, les lombes, la racine des cuisses et le scrotum sont le plus communément atteints, mais il existe d'importantes variations dans la répartition et la densité des angiokératomes selon les patients [28] ;
- des troubles de la sudation avec anhidrose ou, plus communément, hypohidrose [28] ;
- une cornée verticillée qui correspond à des dépôts épithéliaux grisâtres diffus ou linéaires et d'aspect tourbillonnant [25,26] ;
- des douleurs abdominales, une diminution de la tolérance à l'exercice physique, une asthénie, une atteinte cochléovestibulaire [25,26].

Entre 20 et 30 ans (phase quiescente) apparaît en général une protéinurie, à ce stade, les acroparesthésies peuvent diminuer spontanément en fréquence et en intensité.

À l'âge adulte (plus de 30 ans), le tableau clinique évolue vers une maladie multisystémique avec :

- une atteinte rénale caractérisée par une diminution progressive du débit de la filtration glomérulaire (néphropathie glomérulaire) évoluant vers une insuffisance rénale chronique [29] ;
- une cardiomyopathie hypertrophique, troubles du rythme et de la conduction cardiaque [4] ;
- des complications ischémiques cérébrovasculaires [30].

Variants atypiques

Ces sont des variants dits tardifs ou atténués, qui sont dus à des mutations du gène *GLA*, qui sont à l'origine d'une activité enzymatique résiduelle de 2 à 20 % contrairement à la forme classique [17,31].

Les mieux connus sont le variant rénale et le variant cardiaque pour lesquels les signes initiaux tardifs sont des atteintes rénales ou des atteintes cardiaques prédominantes, respectivement. Ainsi, plusieurs études visent à dépister la maladie dans des populations de patients porteurs d'une cardiomyopathie [32] ou qui sont des hémodyalyses chroniques [33].

Femmes hétérozygotés Fabry

Bien que la MF est liée à l'X, les femmes ne sont pas seulement vectrices mais atteintes par la maladie à des degrés divers avec une symptomatologie très variée. Cette hétérogénéité phénotypique est probablement liée à l'inactivation au hasard de l'un des deux chromosomes X, expliquant la coexistence de deux populations cellulaires en proportion variable selon les cas au sein d'un même organe : l'une ayant un déficit en *GLA* et l'autre une activité enzymatique normale.

Le signe clinique le plus fréquent est la cornée verticillée (70 % des conductrices) dont la présence est très utile pour le dépistage. Les angiokératomes et les acroparesthésies sont observés dans 40 % et 10 % des femmes respectivement. L'atteinte des organes vitaux (cœur, cerveau et rein) concerne 23 % des femmes avec un âge médian de 46 ans [5,26].

Démarche diagnostique

Le diagnostic peut être rapidement évoqué dans la forme typique chez un sujet jeune devant les crises douloureuses des extrémités qui sont associées à des angiokératomes et à une ou plusieurs atteintes viscérales. Mais le diagnostic est souvent établi tardivement après l'apparition des premiers signes cliniques de la maladie. Ce décalage dans le temps confirme la non-spécificité des signes cliniques de la maladie, mais aussi, une certaine méconnaissance de cette pathologie dans la communauté médicale, principalement en raison de sa rareté. Le diagnostic de la MF est clinique, mais aussi biologique par mesure de l'activité de l'enzyme déficiente et/ou génotypage du gène *GLA* [34].

Éléments de suspicion

Le clinicien doit systématiquement penser à la MF devant un sujet jeune présentant des signes cliniques inexplicables [35] :

- crises douloureuses des extrémités ;
- crises algiques hyperthermiques ;
- arthralgies au long cours, en particulier des interphalangiennes ;
- protéinurie ;
- diabète insipide néphrogénique ;

- accidents ischémiques transitoires, souvent récidivants chez un jeune homme ;
- surdité neurogène d'apparition brutale ;
- cardiomyopathie ;
- infarctus du myocarde chez un sujet jeune sans facteur de risque.

En présence de symptômes et/ou de signes cliniques suggestifs de la maladie, la constitution d'un arbre généalogique permet de rechercher les éléments évocateurs d'une affection héréditaire à transmission liée à l'X.

Confirmation biochimique

Mesure de l'activité enzymatique

L' α -GalA catalyse l'hydrolyse de divers substrats artificiels possédant un résidu galactose en position alpha terminale, parmi lesquels le 4-méthylumbelliféryl- α -D-galactopyranoside, substrat synthétique couramment utilisé pour le diagnostic de la MF. Pour améliorer la spécificité de la réaction enzymatique, l'ajout de la N-acétyl D-galactosamine est indispensable pour inhiber l' α -N-acétyl galactosaminidase. Cette dernière sera à l'origine d'une erreur par excès de l'ordre de 20 % lors de l'interprétation des résultats [34,36]. Le déficit enzymatique en α -Gal A peut être mis en évidence dans le plasma, le sérum, les leucocytes, les fibroblastes cutanés en culture et les villosités choriales [36].

La méthode fluorimétrique peut être appliquée également sur une goutte de sang fixé sur du papier filtre, ce qui permettrait un stockage de l'échantillon jusqu'à six mois tout en gardant la stabilité de l'enzyme (contrairement aux concentrés leucocytaires) [37].

Chez les hémizygotés, la détermination de l'activité α -GalA est la méthode de référence pour la confirmation diagnostique. La mesure de l'activité α -GalA permet en outre de distinguer les hémizygotés atteints des variants de la maladie, qui ont une activité α -GalA résiduelle, allant de 5 à 20 % de la normale [14,38]. L'enzymologie permet également le diagnostic prénatal à partir des villosités choriales ou des cellules amniotiques en culture [39].

L'identification des femmes conductrices de la maladie par l'enzymologie est beaucoup moins fiable. De nombreux hétérozygotés ont des valeurs intermédiaires d'activité α -GalA dans différents échantillons biologiques. Du fait de l'inactivation fonctionnelle d'un des deux chromosomes X dans chaque cellule, les hétérozygotés peuvent avoir des activités enzymatiques allant théoriquement de zéro à la normale [38]. Pour établir un diagnostic enzymatique d'hétérozygotie plus fiable, la confirmation de l'existence de deux populations cellulaires, normales et mutées, peut-être réalisée par dosage enzymatique sur des racines des cheveux, ou sur des fibroblastes cutanés en culture [35]. Toutefois, ces deux méthodes exigent des procédures expérimentales répétitives et fastidieuses.

Dosage des céramides urinaires

Le Gb3 urinaire provenant de la desquamation des cellules tubulaires rénales constitue le meilleur marqueur de la MF comparé au Gb3 plasmatique [38]. Ainsi, la spectrométrie de masse en tandem (technique MS/MS), est une microméthode

particulièrement sensible et spécifique qui a permis le développement du dosage de Gb3 urinaire [40].

Chez les hommes hémizygotés pour la MF, le dosage du Gb3 urinaire permet de confirmer le diagnostic, et éventuellement d'établir une corrélation avec les signes cliniques, si l'on est en présence d'une forme classique ou d'un variant de la maladie [40].

Chez les femmes, le diagnostic des hétérozygotés est nettement plus informatif par le dosage du Gb3 urinaire que par la mesure de l' α -Gal A leucocytaire. Chez une femme, la normalité de ces analyses (α -Gal A et Gb3) ne permet jamais d'exclure complètement le diagnostic de la MF, qui peut être confirmé uniquement par l'étude du gène *GLA* [38].

Un Gb3 urinaire significativement élevé au moment du diagnostic permettrait le suivi de la thérapeutique enzymatique substitutive.

Étude moléculaire du gène *GLA*

Le gène *GLA* est de petite taille et le séquençage complet des sept exons et des jonctions introns-exons permet l'identification de la mutation responsable. Les études familiales sont alors faciles par la recherche de la mutation ainsi identifiée qui permet en particulier d'affirmer ou d'exclure le diagnostic chez les femmes apparentées [14–16].

Si le cas index familial est une femme, le dosage du Gb3 urinaire permet d'orienter le diagnostic mais seule l'étude du gène permet d'affirmer le diagnostic si une mutation connue est identifiée.

Diagnostic histologique

Toute biopsie (cutanée, rénale, endomyocarde...) est potentiellement informative dans la mise en évidence d'une surcharge lipidique caractéristique de la MF. La découverte sur biopsie d'organe d'une microvacuolisation cellulaire et surtout d'inclusions denses intracellulaires ou figures myéliniques, en microscopie électronique, permet de poser le diagnostic de la maladie [41,42].

Autres marqueurs et biomarqueurs

Certaines anomalies biologiques sont observées chez des patients atteints de la MF tel que l'anémie, la carence en vitamine D l'hyperhomocystéinémie, l'élévation du HDL cholestérol et l'augmentation du Lp (a). L'examen des sédiments urinaires peut révéler des cylindres et des érythrocytes. Des taux élevés de peptide natriurétique B (BNP) et de troponine Ic ont été trouvés chez des patients présentant une hypertrophie ventriculaire gauche avancée [43].

Dans la MF, des biomarqueurs plasmatiques et urinaires ont été proposés mais qui ne sont pas spécifiques de la maladie.

Une légère élévation du taux de la chitotriosidase plasmatique a été rapportée chez des patients masculins, mais pas chez les femmes hétérozygotés [44].

Une augmentation du globotriaosylsphingosine plasmatique ou du lyso-Gb3 a été signalée chez les patients atteints de la MF [44]. Le Lyso-Gb3 est considéré comme un facteur de risque indépendant pour le développement de lésions cérébrovasculaires chez les hémizygotés, alors que chez

les femmes, la concentration plasmatique de lyso-Gb3 est corrélée à la sévérité de la maladie. De plus, le Lyso-Gb3 urinaire peut contribuer dans l'apparition de la lésion glomérulaire des patients en favorisant la libération de médiateurs secondaires (*transforming growth factor-beta1* [TGF- β 1] et le récepteur du facteur d'inhibition des macrophages CD74) [44].

La sphingosine-1-phosphate (S1P) a été identifiée comme une activité biologique favorisant la croissance des facteurs impliqués dans le remodelage cardiovasculaire chez les hémizygotés et les femmes ayant la MF.

Par ailleurs, il y a une forte corrélation entre les taux plasmatiques de la S1P et l'indice de masse ventriculaire gauche (MVL), ainsi que l'élévation de l'épaisseur intima-média (EIM) carotidien chez les patients ayant la MF [45].

Traitement et prise en charge

Avant l'introduction de l'enzymothérapie substitutive, le traitement de la MF est basé sur le traitement symptomatique. Les acroparesthésies douloureuses sont traitées au mieux par les carbamazépines et/ou la diphenylhydantoïne [46]. Pour les angiokératomes, l'utilisation du laser est proposée pour empêcher la formation de nouvelles lésions [47]. En cas de protéinurie, une néphroprotection basée sur la prescription à dose optimale d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou d'un agoniste des récepteurs de l'angiotensine [48] est recommandée. La transplantation rénale doit être préférée à l'hémodialyse en cas d'insuffisance rénale terminale. La prescription de spironolactone, l'arrêt du tabac, l'utilisation d'antiagrégants plaquettaires, le contrôle du profil lipidique et une supplémentation en acide folique sont classiquement recommandés pour la prévention du risque d'atteinte vasculaire chez les patients atteints MF [49].

Depuis 2001, l'efficacité d'un traitement spécifique, l'enzymothérapie substitutive par perfusions d' α -GalA recombinante a été évaluée dans différents essais cliniques ayant conduit à l'autorisation de mise sur le marché de deux enzymes recombinantes l'agalsidase α (REPLAGAL®) et l'agalsidase β (FABRAZYME®) [50]. Les résultats des essais cliniques ont démontré le bénéfice clinique de l'ERT pour améliorer la qualité de vie, stabiliser la fonction rénale et diminuer l'hypertrophie ventriculaire gauche [50–52]. Pour l'agalsidase β , des bénéfices histologiques et biochimiques évidents en termes de clairance du substrat des cellules endothéliales des reins, de la peau et du cœur avec réduction des taux de Gb3 plasmatiques et urinaires [4,53] ont été rapportés. Un traitement précoce reste indispensable pour atteindre les buts thérapeutiques, cependant le traitement à long court induit l'apparition des anticorps IgG contre l'agalsidase α . Compte tenu de l'expression phénotypique hétérogène de la maladie, il est indispensable de recueillir des données complémentaires sur l'histoire naturelle de la maladie et les bénéfices cliniques de l'enzymothérapie dans les populations pédiatriques et sur les femmes hétérozygotes afin de mieux apprécier l'efficacité et la tolérance au long cours de l'enzymothérapie substitutive.

D'autres stratégies thérapeutiques spécifiques se sont développées à fin de produire des molécules présentant une meilleure biodisponibilité (administré par voie orale, traverse

la barrière hémato-encéphalique...), non immunogène et ayant un prix de production faible. Parmi les thérapies actuellement explorées dans le traitement de la MF, il y a la thérapie génique, la réduction du substrat, les activateurs enzymatiques et les molécules chaperonnes. Seules les molécules chaperonnes constituent actuellement une alternative thérapeutique potentielle pour la MF. Ces petites molécules vont se lier à l'enzyme mutée, permettant ainsi un repliement et une maturation correcte de l'enzyme et en fin facilite son adressage vers le lysosome. Les effets des molécules chaperons ont été explorés dans d'autres maladies lysosomales tel que la maladie de Gaucher et la maladie de Pompe. La deoxygalactonojirimycin inhibiteur de GLA est la seule molécule chaperonne qui a été évaluée par des essais cliniques. Ce traitement est proposé comme un complément de l'ERT [51].

Conclusion

La MF est une maladie de surcharge lipidique qui entraîne une dysfonction progressive des fonctions vitales. Ce caractère progressif rend le diagnostic souvent tardif où l'enzymothérapie substitutive n'est pas efficace. Un dépistage (clinique, biochimique et génétique) des sujets à risque est indispensable pour une meilleure prise en charge thérapeutique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Fabry J. Ein Beitrag Zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Habrae). Arch Dermatol Syph 1898;43:187–200.
- [2] Anderson W. A case of "angeio-keratoma". Br J Dermatol 1898;10:113–7.
- [3] Mehta A, Beck M, Eyskens F, Feliciani C, Kantola I, Ramaswami U, et al. Fabry disease: a review of current management strategies. QJM 2010;103:641–59.
- [4] Lidove O, Jung B, Brochet E, Himbert D, Delieu F, Laissy JP, et al. Maladie de Fabry : maladie systémique. MT Cardio 2006;2(3):355–65.
- [5] Pinto LL, Viera TA, Giugliani R, et al. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. Orphanet J Rare Dis 2010;5:14.
- [6] Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA 1999;281:249–54.
- [7] Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet 2006;79:31–40.
- [8] Hwu WL, Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, et al. Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A (IVS4+919G>A). Hum Mutat 2009;30:1397–405.
- [9] Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. J Mol Biol 2004;337(2):319–35.

- [10] Guce AI, Clark NE, Salgado EN, Ivanen DR, Kulminskaya AA, Brumer H, et al. Catalytic mechanism of human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* 2010;285:3625–32.
- [11] Bekri S. Importance of glycosylation in enzyme replacement therapy. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006 [Chapter 5].
- [12] Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3903–7.
- [13] Desnick RJ, Ioannou Y, Eng CM. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly D, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, vol. 3. 8th ed. New York: Mc GrawHill; 2001. p. 3733–74.
- [14] Schaefer E, Mehta A, Gal A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl* 2005;94:87–92.
- [15] Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006;2:297–309.
- [16] Elstein D, Altarescu G, Beck M, Gal A. Molecular genetics of Fabry disease and genotype-phenotype correlation. In: *Fabry disease*. Dordrecht, Heidelberg, London, New-York: Springer; 2010, p. 3–19 [Chapitre 1].
- [17] Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, Yasuda K, Wu HL, Garman SC, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 2007;406:285–95.
- [18] Ishii S, Suzuki Y, Fan JQ. Role of Ser-65 in the activity of alpha-galactosidase A: characterization of a point mutation (S65T) detected in a patient with Fabry disease. *Arch Biochem Biophys* 2000;377:228–33.
- [19] Motabar O, Sidransky E, Goldin E, Zheng W. Fabry disease—current treatment and new drug development. *Curr Chem Genomics* 2010;4:50–6.
- [20] Hakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochimica Biophysica Acta* 2008;1780(3):325–46.
- [21] Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2812–7.
- [22] Lücke T, Höppner W, Schmidt E, Illsinger S, Das AM. Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Mol Genet Metab* 2004;82:93–7.
- [23] Shen JS, Meng XL, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, et al. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab* 2008;95:163–8.
- [24] Das AM, Naim HY. Biochemical basis of Fabry disease with emphasis on mitochondrial function and protein trafficking. *Adv Clin Chem* 2009;49:57–71.
- [25] Hopkin RJ, Bissler RJ, Banikazemi M, Clarke L, Eng CM, Germain DP, et al. Characterization of Fabry Disease in 352 pediatric patients in the Fabry Registry. *Pediatr Res* 2008;64:550–5.
- [26] Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, et al. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inher Metab Dis* 2007;30:184–92.
- [27] Charrow J. A 14-year-old boy with pain in hands and feet. *Pediatr Ann* 2009;38:190–2.
- [28] Orteu CH, Jansen T, Lidove O, Jaussaud R, Hughes DA, Pintos-Morell G, et al. Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry Outcome Survey. *Br J Dermatol* 2007;157:331–7.
- [29] Ortiz A, Cianciaruso B, Cizmarik M, Germain DP, Mignani R, Oliveira JP, et al. End-stage renal disease in patients with Fabry disease: natural history data from the Fabry Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:769–75.
- [30] Sims K, Politei J, Banikazemi M, Lee. Stroke in Fabry disease frequently occurs before diagnosis and in the absence of other clinical events: natural history data from the Fabry Registry. *Stroke* 2009;40:788–94.
- [31] Germain DP. A new phenotype of Fabry disease with intermediate severity between the classical form and the cardiac variant. *Contrib Nephrol* 2001;136:234–40.
- [32] Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H, Tei C, Lee P, McKenna WJ, et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;105:1407–11.
- [33] Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a “renal variant” phenotype. *Kidney Int* 2003;64:801–7.
- [34] Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, Donaldson ML. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry disease. *Clin Chim Acta* 1981;112:247–51.
- [35] Mehta A, Hughes DA. Fabry Disease. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, (editors). *Gene Reviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2002 Aug 05 [updated 2011 Mar 10]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301469>
- [36] Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, Raman MK, Bernlohr RW, Krivit W. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973;81:157–71.
- [37] Caudrona E, Germain DP, Prognona P. Dépistage de la maladie de Fabry par mesure de l'activité enzymatique de gouttes de sang séché sur papier filtre. *Rev Med Interne* 2010;31:S263–9.
- [38] Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006 [Chapter 18].
- [39] Kleijer WJ, Huisaarts-Odijk LM, Sachs ES, Jahoda MG, Niermeijer MF. Prenatal diagnosis of Fabry's disease by direct analysis of chorionic villi. *Prenat Diagn* 1987;7:283–7.
- [40] Piraud M, Maire I, Froissart R. Intérêt du dosage du globotriaosylcéramide urinaire pour le diagnostic et le suivi du traitement de la maladie de Fabry. *Rev Med Interne* 2010;31:S270–4.
- [41] Navarro C, Teixeira S, Dominguez C, Fernandez JM, Rivas E, Fachal C, et al. Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients. *Acta Neuropathol* 2006;111:178–85.
- [42] Doldan-Silvero AM, et al. Electron microscopy in end stage renal disease: a case of Fabry's disease. *Ultrastruct Pathol* 2010;34(5):307–13.
- [43] Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:30.
- [44] Aerts JM, Kallemeijn WW, Wegdam W, Joao Ferraz M, van Breemen MJ, Dekker N, et al. Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibitors. *J Inher Metab Dis* 2011;34:605–19.
- [45] Brakch N, Dormond O, Bekri S, Golshayan D, Corvejon M, Maz-zolai L, et al. Evidence for a role of sphingosine-1 phosphate in cardiovascular remodelling in Fabry disease. *Eur Heart J* 2010;31:67–76.

- [46] Lenoir G, Rivron M, Gubler MC, Dufier JL, Tome FS, Guivarch M. Fabry's disease Carbamazepine therapy in acrodyniform syndrome. *Arch Fr Pediatr* 1977;34:704–16.
- [47] Eng CM, Germain DP, Banikazemi M, Warnock DG, et al. Guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med* 2006;8:539–48.
- [48] Tahir H, Jackson LL, Warnock DG. Antiproteinuric therapy and Fabry nephropathy: sustained reduction of proteinuria in patients receiving enzyme replacement therapy with agalsidase-beta. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2609–17.
- [49] Pisani A, Visciano B, Roux GD, Sabbatini M, Porto C, Parenti G, et al. Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of the literature. *Mol Genet Metab* 2012;107:267–75.
- [50] Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A—replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001;345:9–16.
- [51] Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinski DA, Charrow J, Desnick RJ, et al. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase beta therapy in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1547–57.
- [52] Weidemann F, Niemann M, Breunig F, Herrmann S, Beer M, Störk S, et al. Long-term effects of enzyme replacement therapy on Fabry cardiomyopathy: evidence for a better outcome with early treatment. *Circulation* 2009;119:524–9.
- [53] Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, Dikman S, Gordon RE, Collins AB, et al. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int* 2002;62:1933–46.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



REVUES GÉNÉRALES ET ANALYSES PROSPECTIVES

Les anticorps anti-spermatozoïdes chez l'homme : de la physiopathologie à la thérapeutique

Antisperm antibodies in men: From the physiopathology to therapeutics

H. Elloumi*, D. Haj Mahmoud, K. Kacem, M. Khrouf, A. Bouzouita, F. Zhioua, A. Zhioua

Service de gynécologie-obstétrique et de médecine de la reproduction, centre de procréation médicalement assistée, hôpital Aziza-Othmana, La-Kasba, 1008 Tunis, Tunisie

Reçu le 27 février 2013 ; accepté le 7 avril 2013

KEYWORDS

Antisperm antibodies;
Antigen;
Immunological
infertility;
MAR Assay;
Insemination

MOTS CLÉS

Anticorps
anti-spermatozoïdes ;
Antigène ;
Infertilité
immunologique ;
MAR Test ;
Insémination

Summary Immunoinfertility is an important problem, involving a significant number of infertile men. According to the literature many factors can induce the development of antisperm antibodies (ASA) in the male serum of genital fluids such as genital trauma, history of genital infections, varicoceles and vasectomy. Antisperm antibodies can impair the fertilizing capacity of spermatozoa by decreasing the semen parameters, mucus penetration and by inhibiting sperm–oocyte interaction. Moreover, ASA may have a deleterious effect on embryo development and implantation. Various methods have been proposed to reduce ASA production and to treat this class of infertility. In the present review, we note the different physiopathological mechanisms responsible for the production of ASA in humans, various detection techniques ASA, their involvement in the couple's infertility and the different therapeutic methods to propose in the case of the immune infertility.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Les anticorps anti-spermatozoïdes (ASA) forment une catégorie de glycoprotéines fréquemment rencontrée chez les hommes infertiles. Les facteurs physiopathologiques à l'origine du développement de cette auto-immunité sont à nos jours mal définis. Cependant, les traumatismes testiculaires, les antécédents d'infections urogénitales, les cures de varicocèle, la vasectomie ainsi que les pratiques homosexuelles sont toujours évoqués dans les cas d'une infertilité immunologique. Cette catégorie d'anticorps est à l'origine d'une altération de la capacité du spermatozoïde à franchir le mucus cervical et à interagir avec l'ovocyte. De plus, les ASA peuvent altérer le développement embryonnaire et son implantation au niveau de l'endomètre de la femme. Plusieurs stratégies ont été proposées soit pour réduire les taux de ces ASA dans le sperme ou le sérum de l'homme ou encore pour traiter les couples souffrant d'une telle infertilité. Dans cette présente revue, nous relevons les différents mécanismes physiopathologiques à l'origine de la production des ASA chez l'homme, les différentes techniques de mise en

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : elloumichaabanehanen@yahoo.fr (H. Elloumi).

évidence des ASA, leur implication dans l'infertilité du couple ainsi que les différents moyens thérapeutiques à proposer dans le cadre de cette infertilité d'origine immunologique.
© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Selon l'Organisation Mondiale de la santé, l'infertilité est définie par l'absence de grossesse après au moins 12 mois de rapports non protégés [1]. On peut considérer l'infécondité comme primaire, lorsque la femme n'a jamais conçu et secondaire lorsqu'elle a conçu au moins une fois, mais ne peut parvenir à être de nouveau enceinte [2]. Dans de nombreuses cultures, la femme est considérée comme le seul responsable de l'infertilité conjugale, la science vient ainsi contredire ce raisonnement traditionnel, non fondé et met l'accent sur l'implication de l'homme dans le retard ou l'absence de grossesse. En effet, dans environ un tiers des cas, l'infertilité est d'origine masculine et dans un second tiers les facteurs masculins et féminins sont associés, on parle alors d'une infertilité d'origine mixte [3].

Les causes de l'infertilité masculine sont variables et incluent notamment les causes immunologiques. En effet, la relation entre les anticorps anti-spermatozoïdes (ASA) et l'infertilité est reconnue [4] et la prévalence des anticorps anti-spermatozoïdes chez les hommes infertiles est à peu près 26 fois plus que chez les hommes fertiles. Mais la survenue de grossesse chez des couples dont l'homme présente de tels anticorps rend l'incrimination de ce concept immunologique dans l'infertilité un fait relatif et variable selon le taux, l'isotype, le site de fixation et l'action des ASA. Dans cette présente revue, nous relevons les différents mécanismes physiopathologiques à l'origine de la production des ASA chez l'homme, les différentes techniques de mise en évidence des ASA, leur implication dans l'infertilité du couple ainsi que les différents moyens thérapeutiques à proposer dans le cadre de cette infertilité d'origine immunologique.

Antigénicité du spermatozoïde

Différentes stratégies ont permis l'identification de nombreux antigènes spermatiques. L'une des méthodes utilisées est celle des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines de surface du spermatozoïde. Ces anticorps sont récupérés à partir du sérum des patients infertiles ou vasectomisés [5]. Parmi les antigènes spermatiques identifiés, nous citons certaines protéines principales :

- la FA-1 : est une glycoprotéine ayant un poids moléculaire de 68/70 kDa localisée sur la membrane plasmique des cellules germinales mâles ;
- la LDH-C4 : trouvée exclusivement au niveau des spermatozoïdes ;
- la DE : est une protéine impliquée dans la fusion des gamètes lors de la fécondation ;
- la P34H : est une protéine qui joue un rôle important dans le processus de la fécondation ;
- le P26H : cet antigène est acquis au cours de la maturation épидидymaire du spermatozoïde et il intervient dans la

liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'ovocyte secondaire ;

- PH-30 : protéine de surface impliquée dans la fusion entre le spermatozoïde et l'ovocyte ;
- SP-10 : protéine intra-acrosomiale du spermatozoïde interagissant avec la ZP.

La notion d'antigénicité ou d'immunogénicité du spermatozoïde est prouvée depuis plus d'un siècle, c'est en 1899 que Landstein a démontré que l'injection de sperme hétérologue provoque la production des ASA chez le cobaye [6], puis Metchnikoff a été le premier à démontrer que même l'injection de spermatozoïdes homologues dans la circulation sanguine pourrait induire une réponse immunitaire chez l'animal. La présence des ASA humains a été mise en évidence par Nakabayashi et al. Ces anticorps ont été trouvés aussi bien chez l'homme que chez la femme [6].

Production des anticorps anti-spermatozoïdes (ASA)

Les ASA sont des immunoglobulines (Igs) sécrétées par les lymphocytes B suite à une activation antigénique. La production des ASA est due essentiellement au passage des antigènes spermatiques dans la circulation sanguine à la suite de la rupture de la barrière hémato-testiculaire et leurs interactions avec les cellules immunocompétentes. Cette production peut être expliquée par le concept de l'antigène exclu. En effet, contrairement aux autres molécules du soi vis-à-vis desquelles l'organisme développe une tolérance immunitaire centrale à un âge précoce, les marqueurs spécifiques des spermatozoïdes ne sont produits qu'à partir de la puberté. De ce fait, ces antigènes ne seront pas reconnus comme appartenant au soi et provoquent ainsi une réaction immunitaire qui se traduit par la production des anticorps dirigés contre ces épitopes spermatiques [7]. La production d'ASA ne serait pas due exclusivement à un contact entre le système immunitaire et les antigènes spermatiques mais pourrait être la conséquence de l'existence d'une communauté antigénique et de la possibilité de réaction croisée avec certains antigènes microbiens.

Ces anticorps peuvent être immobilisants, agglutinants ou cytotoxiques.

Les ASA renferment des anticorps de trois catégories :

- des IgA anti-spermatozoïdes : les IgA sont caractérisées par leur chaîne lourde α . Dans le sérum, elles sont majoritairement sous forme monomérique alors qu'elles sont dimériques dans les sécrétions et sont ainsi appelées IgA sécrétoires. Elles sont dotées d'un pouvoir agglutinant des spermatozoïdes grâce à leur valence. Ces dernières sont sécrétées essentiellement au niveau de l'épididyme ;
- des IgG anti-spermatozoïdes : les IgG constituent la classe d'anticorps la plus importante dans l'organisme,

caractérisées par leur chaîne lourde gamma. Il s'agit d'anticorps monomériques. Elles sont dotées d'un pouvoir cytotoxique ;

- des IgM anti-spermatozoïdes : sont caractérisées par leur chaîne lourde μ . Les IgM sont les premiers anticorps synthétisés lors de la réponse immunitaire, ce sont des anticorps agglutinants par excellence grâce à leur valence élevée et entraînent l'activation du complément (les IgM circulantes sont pentamériques). Cependant, il s'agit de molécules de grand poids moléculaire : 970 KD qui ne traversent pas la barrière cellulaire.

Effets des anticorps anti-spermatozoïdes sur la fertilité

La présence des ASA chez l'homme entraîne une perturbation de nombreuses étapes indispensables à la fécondation normale et peut avoir ainsi des effets défavorables sur la fertilité :

- l'agglutination des spermatozoïdes [6] ;
- la diminution de la mobilité des spermatozoïdes [6] : les anticorps immobilisants se forment moins fréquemment mais leur influence sur la fertilité est plus importante que les anticorps agglutinants ;
- la diminution de la numération des spermatozoïdes, dans la mesure où les ASA pourraient avoir un effet cytotoxique sur les spermatozoïdes, à la suite de l'activation de la voie classique du complément et la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM), qui entraîne leur cytolysse [6]. En revanche, certaines études ont démontré que la spermatogenèse n'est pas affectée par les ASA [8] ;
- l'inhibition de la pénétration des spermatozoïdes dans la glaire cervicale (propriété liée à l'IgA) [9] ;
- l'inhibition de la capacitation [6] ;
- l'inhibition de la réaction acrosomique. En effet, une étude réalisée par Tsukui et al. a démontré que les spermatozoïdes des donneurs fertiles deviennent incapables de pénétrer la zone pellucide des ovocytes secondaires à la suite de leur incubation avec des ASA [10] ;
- l'inhibition de la fécondation, d'autant plus qu'il a été prouvé que les anticorps ont la capacité de pénétrer la zone pellucide. La diminution du pourcentage de clivage embryonnaire. Naz a prouvé que les embryons issus de la fécondation d'un ovocyte secondaire et un spermatozoïde recouvert d'anticorps présentent des clivages anormaux [11] ;
- la perturbation de l'implantation de l'œuf [11] ;
- augmentation des taux de fausses couches. En effet, Lahteenmaki et al. ont enregistré un pourcentage de fausses couches égales à 38,5 % à la suite de la pratique d'une injection intracytoplasmique (ICSI) en utilisant des spermatozoïdes recouverts d'anticorps [12].

Mise en évidence des anticorps anti-spermatozoïdes : techniques et interprétation

Chez l'homme, les ASA peuvent être détectés dans le sérum des hommes et des femmes et dans le liquide séminal à des

concentrations assez variables selon la période du cycle chez les femmes et l'état inflammatoire chez les hommes.

Un nombre très important de tests immunologiques sont utilisés dont on peut citer : la réaction d'agglutination mixte (Mixed Antiglobulin Reaction Test [MAR Test]), le test de fixation des immunobilles direct (Immunobead Test [IBT]) et les tests dépendants du complément.

Réaction d'agglutination mixte

Il s'agit d'une technique simple et rapide qui se base sur l'utilisation de billes de latex couplées à des immunoglobulines humaines. Ces billes sont mélangées avec le sperme frais à étudier, l'ajout du sérum anti-Igs humaines (Igs de lapin anti-Igs humaines) entraîne l'agglutination des ASA. L'absence de spermatozoïdes recouverts de billes de latex témoigne de la non-existence des ASA. En cas de présence des anticorps, les billes de latex recouvrent partiellement les spermatozoïdes.

Les pourcentages établis seront interprétés comme suit :

- 0–9 % : le test est considéré négatif ;
- 10–49 % : le test est douteux ;
- supérieur à 50 % : le test est positif.

Le MAR Test direct ne peut être réalisé que lorsqu'une quantité suffisante de spermatozoïdes mobiles est présente dans l'éjaculat :

- le test peut manquer de précision si le pourcentage des spermatozoïdes mobiles est inférieur à 20 % ;
- si la concentration des spermatozoïdes est inférieure à 10 millions de cellules par mL, seule la lecture après trois minutes serait possible.

Au-dessous de 5×10^6 spermatozoïdes par mL, une mobilité supérieure à 50 % est nécessaire pour pouvoir réaliser le test.

Test de fixation des immunobilles direct

Il nécessite un lavage préalable des spermatozoïdes, ce qui permet l'élimination des immunoglobulines libres minimisant ainsi les faux négatifs [13].

L'IBT se base sur l'utilisation de billes de polyacrylamide couplées à des anticorps anti-IgA, IgM et IgG humaines. L'intérêt de ce test est de définir le type d'immunoglobulines fixées sur le spermatozoïde et de visualiser la localisation des billes (au niveau de la tête, de la pièce intermédiaire, du flagelle ou localisation mixte). Ce test est considéré positif si plus de 20 % des spermatozoïdes mobiles sont porteurs de billes.

Tests dépendants du complément

Les ASA peuvent être détectés grâce à leur capacité de fixer le complément à la suite de leurs interactions avec les épitopes spermatiques. Les complexes immuns ainsi formés activent la voie classique du complément en entraînant la lyse des spermatozoïdes. Cet effet cytolitique peut être

évalué par l'utilisation de colorants spécifiques, tels que l'éosine, qui traversent la membrane des cellules mortes.

Cette catégorie de test est limitée à la détection des IgG et des IgM (les anticorps fixant le complément) et ne peut pas être utilisée pour la mise en évidence des IgA.

Indications de la recherche des anticorps anti-spermatozoïdes chez l'homme

Signes révélateurs biologiques

Le spermogramme est l'examen biologique de référence pour explorer une infertilité masculine. L'auto-immunisation est recherchée en cas d'une :

- agglutination spontanée du sperme, cette dernière se produit lorsqu'au moins deux paratopes des anticorps se fixent sur au moins deux cellules séparées, mais la présence d'agglutination n'est pas toujours due à la présence des ASA ;
- nécrospérmié peut être associée à la présence des ASA cytotoxiques, la recherche d'une auto-immunisation est aussi recommandée ;
- altération de la mobilité des spermatozoïdes avec ou sans phénomène de *shaking* lié à la présence des IgA. Cette classe d'immunoglobuline a tendance à se lier par sa partie Fc aux micelles du mucus cervical [9]. Cette liaison se traduit par un mouvement non coordonné des spermatozoïdes. Ce phénomène peut être mis en évidence par le test de contact des spermatozoïdes avec le mucus cervical en période préovulatoire : Sperm-cervical Mucus Contact Test (SCMCT) de Kremer et Jager ;
- oligospermie, c'est-à-dire une concentration des spermatozoïdes est inférieure à 20 millions de spermatozoïdes par mL ;
- leucospermie (lorsque plus d'un millions de leucocytes sont présents par mL de sperme).

Signes révélateurs cliniques

Antécédents urogénitaux

Cryptorchidie. La cryptorchidie est l'absence de la descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum pendant la vie intra-utérine. Mais une étude réalisée par Lenzi et al. a démontré la non-implication de la cryptorchidie suivie d'une orchidopexie à un âge prépubère dans la survenue des ASA à l'âge adulte [14].

Cancer testiculaire. Une étude réalisée par Paoli et al. sur 190 patients souffrant d'un cancer testiculaire n'a révélé que trois cas d'IBT positifs. De ce fait, les tumeurs testiculaires ne semblent pas être un facteur d'apparition des ASA [15].

Varicocèle. Gilbert et al. ont démontré, par une technique immunoenzymatique (Elisa), la présence d'ASA chez 32 % des patients souffrant d'une varicocèle [16].

Traumatismes testiculaires. Il est possible que les traumatismes répétés (sports, vélo...) puissent entraîner la formation d'ASA [4].

Infections génitales, urinaires et les inflammations chroniques du tractus génital. Les études sur l'implication des

micro-organismes dans la production des ASA et la notion de réaction croisée sont encore non concluantes. En effet, Blanc et Boubli indiquent que 30 % des hommes ayant eu une infection développent des ASA [17]. De nombreuses études ont prouvé qu'il existe des particules virales, bactériennes et fongiques capables de s'attacher à la membrane du spermatozoïde et de se comporter comme vecteur incitant le système immunitaire à réagir contre ces propres molécules [18]. Toutefois, une étude plus récente réalisée en 2008 par Marconi et al. sur 133 patients ne montre aucune association entre les inflammations ou les infections du tractus génital et les résultats du MAR Test/IBT [19]. De plus, Wolff et al. n'ont pas démontré une relation entre la leucospermie et l'apparition des ASA [20].

Antécédents chirurgicaux

La vasectomie est, à ce jour, la seule méthode de contraception masculine. Presque la moitié des hommes dont les canaux déférents ont été ligaturés développent des ASA immobilisants ou agglutinants. Selon les études, la vasectomie entraîne l'apparition des IgM deux semaines après l'intervention [21]. Meinertz et al. ont étudié le taux de grossesses après réparation chirurgicale d'une vasectomie. Les résultats trouvés confirment l'implication du facteur immunologique dans l'infertilité masculine :

- en présence des IgG seules, le taux de grossesse est de 85,7 % ;
- en présence des IgA seules, le taux de grossesse enregistré est de 42,9 % ;
- si la totalité des spermatozoïdes sont recouverts d'IgA, le taux de grossesse diminue encore de moitié pour atteindre 21,7 % ;
- le taux de grossesse devient nul lors d'une association isotypique avec un taux élevé d'IgG sérique [8].

Biopsie testiculaire. Depuis 1974, Hajort et al. ont démontré la survenue d'ASA à la suite de la pratique d'une biopsie testiculaire [22].

Homosexualité et sodomie

Wolff et Schill ont étudié l'incidence des ASA chez des hommes homosexuels par une technique immunoenzymatique. Les résultats obtenus indiquent que 23,6 % des patients homosexuels sont positifs pour les IgG et/ou IgM. Cette incidence élevée d'ASA chez les homosexuels masculins peut s'expliquer par le contact entre les spermatozoïdes et le système immunitaire et l'absorption du sperme par la muqueuse rectale au cours d'une pénétration anale ou sodomie [23].

En dépit de ces risques, l'origine des ASA n'est pas toujours expliquée. Comme la plupart des maladies auto-immunes, le facteur génétique pourrait expliquer la prédisposition de certaines personnes à développer une auto-immunité par rapport à d'autres. Cette hypothèse a été renforcée par la présence des ASA chez 10 % des cas développant en parallèle des auto-anticorps antithyroïdiens [24].

Toutefois, de nombreux hommes sans antécédents pathologiques développent des ASA.

Moyens thérapeutiques

L'emploi des corticoïdes a été proposé comme traitement de l'infertilité immunologique par Shulman et al. en 1978, une dose de 96 mg/j de méthylprednisolone a été prescrite aux couples souffrant de ce type d'infertilité pendant sept jours par mois, seule une grossesse a été obtenue [25]. Une autre étude comparative plus récente a montré que l'insémination intra-utérine (IIU) avec sperme du conjoint permet d'atteindre des taux de grossesses plus élevés que le traitement par les corticoïdes. De plus, il a été prouvé que les corticoïdes sont non seulement inefficaces par rapport à l'IIU mais présentent aussi des risques sur la santé. L'IIU a montré un potentiel thérapeutique assez important dans ce genre d'infertilité, du fait que la préparation du sperme à inséminer peut réduire les effets agglutinants et cytolytiques des ASA. Cependant, les lavages ordinaires réalisés au cours de l'étape de préparation du sperme n'ont pas montré leur efficacité dans l'élimination des ASA fixés aux spermatozoïdes et la rupture de la liaison anticorps-antigène spermatique, caractérisée par sa forte affinité. Les premières études réalisées à ce propos ont démontré la nécessité de laver le sperme plusieurs fois et de le suspendre dans du sérum albumine humaine (HSA) avant insémination. Mahmoud et Comhaire, quant à eux, ont enregistré un taux de grossesse de 8,6 % par cycle d'IIU avec un sperme collecté dans un milieu contenant 3 % de HSA (agissant comme antioxydant) et dont le plasma séminal a été éliminé rapidement par centrifugation au gradient de densité [13].

Quant à la fécondation in vitro (FIV), une étude réalisée par Ombelet et al. a permis d'enregistrer des taux de grossesse de 64,30 % après un maximum de trois cycles d'insémination artificielle pour 46,60 % à la suite d'une FIV chez 29 couples infertiles dont le conjoint présente des taux d'ASA supérieurs à 50 % avec prédominance des IgG [26]. De point de vue rapport efficacité-prix, l'IIU reste la thérapie de choix dans certains cas d'infertilité immunologique. Cependant, dans les cas les plus sévères et à la suite des échecs d'IIU, il est généralement recommandé de recourir à l'ICSI. En effet, Naggy et al. ont démontré qu'il n'existe pas de différence significative entre les taux de grossesse enregistrés à la suite de la pratique d'une ICSI entre les patients présentant des taux d'anticorps supérieurs à 80 % et ceux présentant des tests négatifs pour les ASA. Toutefois, le nombre des embryons de mauvaise qualité était plus élevé chez ceux qui présentaient des ASA supérieurs à 80 % [27]. Cependant, le succès de l'ICSI dans le traitement de l'infertilité immunologique ont poussé les chercheurs à s'interroger quant à la place de la recherche des anticorps en pratique clinique à l'heure de l'ICSI [3], mais reste à savoir que le but réel de la recherche des ASA chez l'homme comme chez la femme n'est pas seulement de trouver n'importe quelle thérapie, mais plutôt de mettre en œuvre une stratégie préventive et orienter le couple vers la méthode la plus rapide, la moins pénible et la plus adaptée à leur cas.

En effet, il est important d'accorder plus d'importance aux paramètres qui peuvent évoquer la présence des ASA dans le sperme du conjoint telles les agglutinants, de recourir aux méthodes enzymatiques qui ont prouvé leurs potentiels dans la réduction du nombre de

spermatozoïdes fixés en entraînant la rupture de certaines liaisons anticorps-antigène sans pour autant altérer le pouvoir fécondant du spermatozoïde. En effet, l'utilisation de la chymotrypsine, une enzyme digestive fabriquée par le pancréas avant IIU avec des échantillons de sperme présentant 100 % de spermatozoïdes recouverts d'anticorps, a donné un taux de grossesse de 11 % par cycle d'IIU [28]. Il est aussi recommandé de chercher ce type d'anticorps dans le sang des patients présentant des taux d'ASA supérieurs à 40 %, d'employer de nouvelles techniques de dépistage des ASA plus précises et plus spécifiques afin de couvrir l'intervalle assez étendu des résultats douteux du MAR Test, d'utiliser l'IBT comme seconde technique permettant de déterminer les taux de spermatozoïdes fixés dans le sperme lavé et de prendre en charge les couples souffrant d'une telle infertilité, sachant que ce type d'immunité peut s'estomper pour un temps puis réapparaître plus tard.

Perspectives

«Le malheur des uns fait le bonheur des autres», cette affirmation semble inclure les ASA qui n'ont pas échappé au regard des industriels. En effet, de nombreuses équipes de recherches se sont orientées vers la conception et le développement de vaccins contraceptifs à base d'antigènes spermatiques, une technique qui semble déjà donner ces fruits chez l'animal mais qui doit encore faire ses preuves sur des échelles plus larges. Les ASA seront alors à la base d'une nouvelle méthode de contraception à la fois idéale et originale qui ouvrira de nouveaux horizons dans le domaine de la contraception masculine.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] World Health Organization. *World Health Organization manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
- [2] WHO manual (1975): *Épidémiologie de l'infécondité*, Genève, Rapport technique, N° 582.
- [3] Khallouk A, Tazi MF, El Fassi MJ, Farib MH. L'infertilité masculine: physiopathologie, bilan et prise en charge. *Esp Med* 2010;17(170):421–9.
- [4] Barthélémy C. Indications de la recherche des anticorps anti-spermatozoïdes. *Andrologie* 2003;13(1):70–80.
- [5] Verdier Y. Identification et caractérisation partielle d'antigènes du spermatozoïde du renard (*Vulpes Vulpes*) en vue de leur utilisation dans un vaccin contraceptif (2002).
- [6] De Muylder X, et al. La stérilité d'origine immunologique. *Can Med Assoc J* 2002;130:591–602.
- [7] Dana A, Rajesh K. Infertility due to antisperm antibodies. *Urology* 1995;46:591–602.
- [8] Meinertz H, Linnet L, Fogh-Andersen P, et al. Antisperm antibodies and fertility after vasovasostomy: a follow-up study of 216 men. *Fertil Steril* 1990;54:315–21.
- [9] Jager S, Kremer J, Kuiken J, Mulder I. The significance of the Fc part of anti spermatozoal antibodies for the shaking

- phenomenon in the sperm-cervical mucus contact test. *Fertil Steril* 1981;36:792–7.
- [10] Tsukui S, Noda Y, Yano J, Fukuda A, Mori T. Inhibition of sperm penetration through human zona pellucida by antisperm antibodies. *Fertil Steril* 1986;46:92–6.
- [11] Naz RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992;46:130–9.
- [12] Lahteenamki I, et al. Treatment of severe male immunological infertility by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:2824–8.
- [13] Mahmoud A, Comhaire F. Antisperm antibodies: use of the mixed agglutination reaction (MAR) test using latex beads. *Hum Reprod* 2000;15:231–3.
- [14] Lenzi, et al. Unilateral cryptorchidism corrected in prepubertal age: evaluation of sperm parameters, hormones and antisperm antibodies in adult age. *Fertil Steril* 1997;5:943–8.
- [15] Paoli, et al. Testicular tumors as a possible cause of antisperm autoimmune response. *Fertil Steril* 1997;2:414–9.
- [16] Gilbert BR, Witkin SS, Goldstein M. Correlation of sperm-bound immunoglobulins with impaired semen analysis in infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 1989;52:469–73.
- [17] Blanc B, Boubli L. Infertilité du couple. Gynécologie. Paris: Édition Pradel; 2003.
- [18] Merzndar S, Levine S. Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril* 1998;70:799–810.
- [19] Marconi M, Nowotny A, Pantke P. Antisperm antibodies detected by mixed agglutination reaction and immunobead test are not associated with chronic inflammation and infection of seminal tract. *Andrology* 2008;40:227–34.
- [20] Wolff H, Polich JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 1990;53:528–36.
- [21] Flickinger CJ, Howards SS, Bush LA, Barker LA, Herr JC. Temporal recognition of sperm auto antigens by IgM and IgG auto antibodies after vasectomy and vasovasostomy. *J Reprod Immunol* 1994;27:135–50.
- [22] Hajort T, Husted S, Linnert-Jepsen P. The effect of testis biopsy on autosensitization against spermatozoal antigen. *Clin Exp Immunol* 1974;18:201–12.
- [23] Wolff H, Schill WB. Antisperm antibodies in infertile and homosexual men: relationship to serologic and clinical findings. *Fertil Steril* 1985;44:673–7.
- [24] Paschke R, Schulze Bertelsbeck D, Tsalmalma K, et al. Association of sperm antibodies with other antibodies in fertile men. *Am J Reprod Immunol* 1994;32:88–94.
- [25] Shulman S, Harlin B, Davis P, Reyniak JV. Immune infertility and new approaches to treatment. *Fertil Steril* 1978;29:309–13.
- [26] Ombelet W, Vandeput H, Janssen M, Cox A, Vossen C, Pollet H, et al. Treatment of male infertility due to sperm surface antibodies: IUI or IVF? *Hum Reprod* 1997;12(6):1167–70.
- [27] Naggy, et al. Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male immunological infertility. *Hum Reprod* 1995;10:1775–80.
- [28] Check JH, Hourani W, Check ML, Graziano V, Levin E. Effect of treating antibody-coated sperm with chymotrypsin on pregnancy rates following IUI as compared to outcome of IVF/ICSI. *Arch Androl* 2004;50:93–5.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Evaluation of the mutagenic potential of a combinational prophylactic transdermal patch by Ames test



Évaluation, à l'aide du test Ames, du potentiel mutagène d'un patch transdermique prophylactique

S. Banerjee^{a,b}, S. Singh^a, R. Policegoudra^a,
P. Chattopadhyay^{a,*}, A. Ghosh^b, V. Veer^a

^a Division of pharmaceutical technology, Defence Research Laboratory, Tezpur 784001, Assam, India

^b Department of pharmaceutical sciences, Birla institute of technology, Mesra 835215, Ranchi, Jharkhand, India

Received 20 May 2013; accepted 27 July 2013

KEYWORDS

Ames test;
Salmonella typhimurium;
Transdermal Patch;
Mutagenicity

Summary

Aims. – The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay is a short-term bacterial reverse mutation assay specifically designed to detect a wide range of that chemical substances which can produce genetic damage that leads to gene mutations.

Methods. – In this study, we evaluated the mutagenic potential of prophylactic transdermal patches containing eserine and pralidoxime chloride (2-PAM) and its placebo patches using TA98, TA100, TA1535 and TA1538 strains of *Salmonella typhimurium* by Ames test. Characterization of the patches was done before the initiation of the study. The assays were performed according to the plate incorporation procedure described by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) recommendations and Ames and Whitfield spot test procedure.

Results. – Both eserine and 2-PAM drugs impregnated patches along with drug unimpregnated patches were not found to be mutagenic.

Conclusion. – This investigation reflects that the patches are non-mutagenic and safe for human use.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Objectifs. – Le test Ames de mutagenicité à partir de microsomes de *Salmonella* est un réactif capable de mettre en évidence à court terme la reversion d'une souche auxotrophe, ce qui

MOTS CLÉS

Test Ames ;

* Corresponding author.

E-mail address: chattopadhyay.drl@gmail.com (P. Chattopadhyay).

Salmonella
typhimurium ;
Patch
transdermique ;
Mutagénicité

permet d'étudier une grande variété de composés chimiques susceptibles de provoquer des mutations géniques.

Méthodes. — Dans cette étude, nous avons évalué à l'aide du test Ames le potentiel mutagénique de patches transdermiques prophylactiques sur différentes souches de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535 et TA1538). Ces patches contenaient de l'ésérine, du chlorure de pralidoxime (2-PAM) et des placebos. L'analyse des patches a été réalisée avant le début des expérimentations. La technique de l'incorporation aux plaques de culture est celle décrite dans les recommandations de l'OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), de la Société Ames et du spot test de Whitfield.

Résultats. — Les patches imprégnés d'ésérine et de 2-PAM, de même que les patches placebo, ne se sont pas révélés mutagènes.

Conclusion. — Nos travaux montrent que les patches analysés sont non mutagènes et donc utilisables pour un emploi chez l'Homme.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

The bacterial reverse mutation test uses amino-acid requiring strains of *Salmonella typhimurium* to detect point mutations, which involve substitution, addition or deletion of one or a few DNA base pairs [1–3]. The principle of this bacterial reverse mutation test is that it detects mutations which revert mutations present in the test strains and restore the functional capability of the bacteria to synthesize an essential amino acid. The revertant bacteria are detected by their ability to grow in the absence of the amino acid required by the parent test strain.

Transdermal patches have been used since antiquity in the treatment of human diseases. They are widely used throughout the world. In addition to transdermal patches, active and inactive pharmaceutical ingredients are also utilized during manufacturing preparations. While these agents may possess pharmacological properties, they may also cause damage, including damage to DNA. It is thus imperative to evaluate the mutagenic potential of prophylactic transdermal patches containing eserine and 2-PAM and its placebo patches because their usage has a major impact on skin and broad health of a large number of people.

Ames test is used worldwide as an initial screening assay to determine the mutagenic potential of wide range of chemicals and drugs. The test is also used for submission of data to regulatory agencies for registration or acceptance of many chemicals, including drugs and biocides. International guidelines have been developed for use by corporations and testing laboratories to ensure uniformity of testing procedures. In the present work, we have evaluated the mutagenic potential of the prophylactic transdermal patches containing eserine and 2-PAM and its placebo patches by the Ames test.

Materials and methods

Test samples

Drugs-in-adhesive matrix type prophylactic transdermal patches containing eserine and 2-PAM and its placebo patches were prepared with the blends of two pressure

sensitive adhesives, (Duro-Tak 387-2287 and Duro-Tak 87-2852) in different volume ratios and different concentrations of permeation enhancer until a homogeneous mixture was obtained. The mixture was degassed, cast on backing membrane (Scotchpak 9732, 3M, USA), dried, and finally attached to a release liner (Scotchpak 1022, 3M, USA). Considering that the patches were pure drugs-in-adhesive matrix type therapeutic system and unlikely to be metabolized by S9 hence, the experiment was conducted only without metabolic activation system.

Bacteria strains

S. typhimurium strains employed in this work were obtained from IMTECH, Chandigarh, India. The strains used were TA98 and TA1538 which detect frameshift mutations, TA100 and TA1535 which detect base pair substitutions.

Medium

An appropriate minimal agar (e.g. containing Vogel-Bonner minimal medium E and glucose) and an overlay agar containing histidine and biotin, to allow for a few cell divisions, was used [1,2,4]. Nutrient broth was obtained from HiMedia laboratories (Mumbai, India); bacteriological agar and nutrient agar were from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Mutagenicity assay using a spot test procedure

The assays were performed according to the plate incorporation procedure described by Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Test Guideline 471 recommendations [5] and Ames and Whitfield [6] spot test procedure. The spot test consists of applying a small amount of the test chemical directly to the center of a selective agar medium plate seeded with the test organism. As the chemical diffuses into the agar a concentration gradient is formed. A mutagenic chemical will give rise to a ring of revertant colonies surrounding the area where the chemical was applied. If the chemical is toxic, a zone of growth inhibition will also be observed [7]. Suspensions of bacterial cells are exposed to the test substance in the absence of

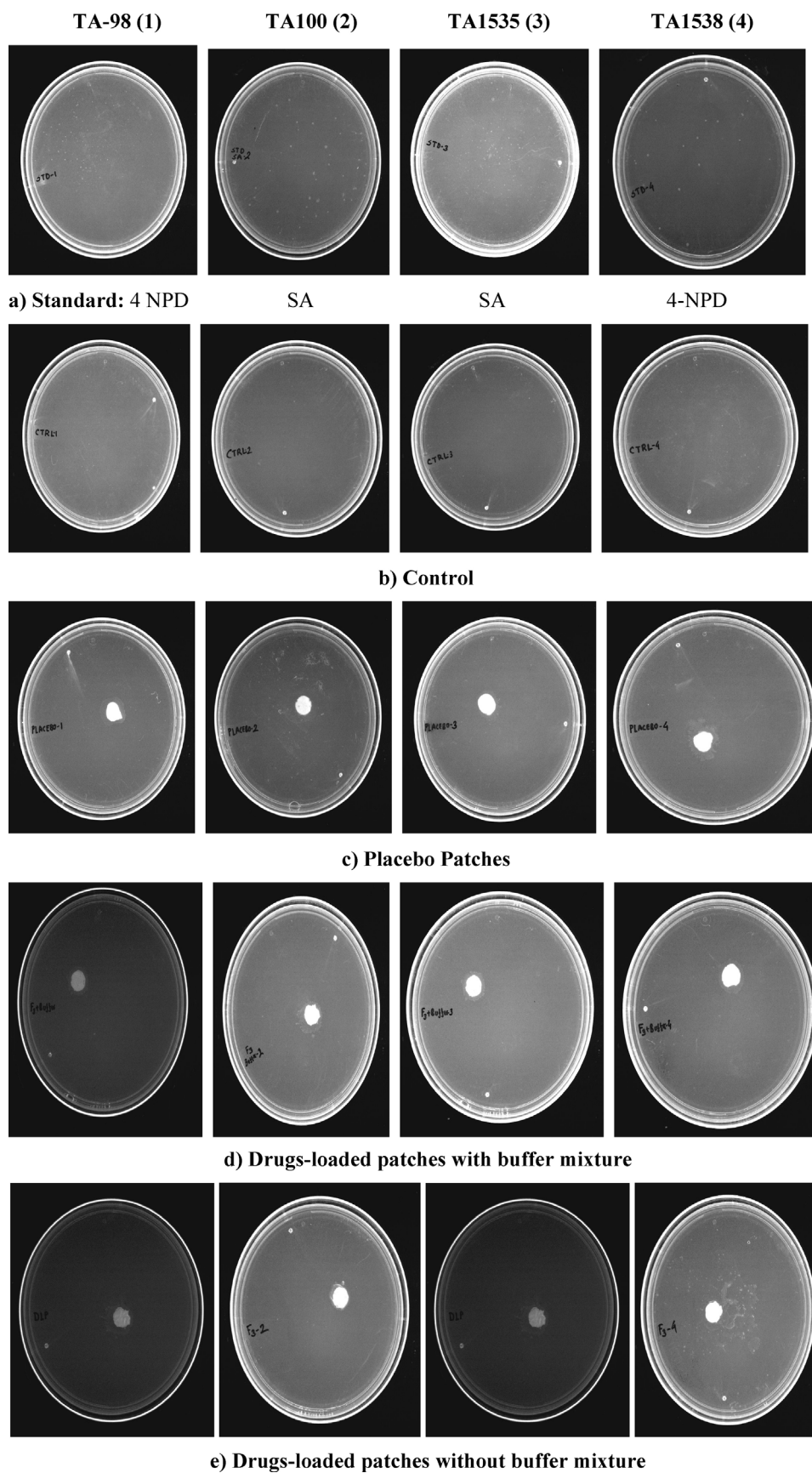


Figure 1 Spot test with different *Salmonella typhimurium* strain.

an exogenous metabolic activation system. The cytotoxicity screening was performed with the different *S. typhimurium* strain using placebo and drugs loaded transdermal patch. Experiments with all strains were conducted with and without the addition of sodium phosphate buffer (0.1 mM, pH 7.4). Negative and positive controls were used simultaneously in each experiment. Negative controls, without test sample was used for all strains. The positive controls used in the assays performed without metabolic activation system, were sodium azide (SA) for TA100 and TA1535 and 4-Nitro-o-phenylenediamine (4 NPD) for TA98 and TA1538 strains. For the plate incorporation method [1,2,8], without metabolic activation, usually the test samples, 0.1 ml of fresh bacterial culture and 0.5 ml of sterile buffer were mixed with 2.0 ml of overlay agar. The contents of each tube were mixed and poured over the surface of a minimal agar plate. The overlay agar is allowed to solidify before incubation. Revertant colonies were counted after 3 days of incubation at 37°C temperature and compared to the number of spontaneous revertant colonies per plate. Three replicates were conducted for each dose group.

Results

For a substance to be considered mutagenic in the Ames assay, the number of revertant colonies per plate containing the test material must be at least more than double the number of colonies per plate containing the negative control. The results of spot test obtained after the treatment of *S. typhimurium* strains with standard control, placebo, drugs loaded transdermal patches with buffer and without buffer mixture were shown in Fig. 1a, 1b, 1c, 1d and 1e respectively. Both the patches were not mutagenic for all the strains tested even in the presence of sodium phosphate buffer mixture. These results suggest that the placebo and drugs loaded transdermal patches were unable to induce base pair substitutions as well as frameshift mutations. Formulations cytotoxicity was also not observed. The negative results were obtained in the Ames test, showing no indication of mutagenic potential in the absence of the S9 mixture. This report provides the first experimental evidence for the non-mutagenic effects of transdermal patches, which is very interesting. The negative results in Ames test for the both type of patches suggests that the application of this formulation is not mutagenic. Pharmaceutical products need to be evaluated as regards their pharmacological properties, toxicity, and period of treatment, visualizing safer utilization.

Discussion

The systematically produced prophylactic drugs-in-adhesive matrix type transdermal patches used in the current study has the composition of eserine and 2-PAM as an active pharmaceutical ingredients (API), two pressure sensitive adhesives, namely Duro-Tak 387-2287 and Duro-Tak 87-2852, and Tween 80 as permeation enhancer. This material varies in its composition. There is a need for more reliable test systems for evaluation of the mutagenicity of such formulations due to the fact that the mutagenic potential of such formulations is still now unexplored. The biological safety of such formulations should not be assumed, since they are not

equivalent in their *in-vitro* biological effects, even within the same class of formulations. The mutagenicity of such formulations is not clear due to the lack of research focusing on this aspect.

The results of the current study are consistent by using the tester strains TA98, TA100, TA1535 and TA1538 to evaluate the biocompatibility of patches by the Ames assay. Mutagenicity was not induced by samples with and without metabolic activation in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, and TA1538. In the present study, tester strains TA98 and TA1538 were used to detect frameshift mutations whereas tester strains TA100 and TA1535 were used to detect base-pair substitution mutations. Different investigators have used different tester strains to determine the mutagenicity of test materials. It is noted that some biomaterials are mutagenic to one tester strain while it is not mutagenic to another. Even though many investigators have sometimes used just 2 strains to determine the mutagenic potential of biomaterials, it is felt that the use of at least four tester strains as recommended by Mortelmans and Zeiger [9] gives a more definite result.

The present investigation, systematically explored the prophylactic drugs-in-adhesive matrix type transdermal patches for any mutagenicity effects. *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535 and TA1538 were used in order to see the effects. For an agent to be considered mutagenic it has to produce at least a twofold concentration-dependent increase in the mean revertants per plate of at least one of these tester strains over the mean revertants per plate of the appropriate vehicle control and there should be a dose-response relationship [10]. The number of revertant colonies/plate with the test material was zero to the number of revertant colonies for the positive control both in the absence of metabolic activation system. The test materials also did not show revertant colonies, hence safe for pharmaceutical purpose.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

One of the authors Subham Banerjee is grateful to Defence Research and Development Organisation, Ministry of Defence, Govt. of India for providing the research fellowship for this work. Subham Banerjee is also thankful to Dr. S.N.Datta, Scientist-C, Defence Research Laboratory, Tezpur, Assam, India for his kind support in this research work and the administration of the Birla Institute of Technology, Mesra, Ranchi, India for providing necessary administrative support for carrying out his Ph.D work.

References

- [1] Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res* 1975;31:347–64.
- [2] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Res* 1983;113:173–215.

- [3] Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, et al. Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res* 1994;312:217–33.
- [4] Green MHL, Muriel WJ, Bridges BA. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res* 1976;38:33–42.
- [5] OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Bacterial Reverse Mutation Test; 1997 <http://www.oecd.org/dataoecd/18/31/1948418.pdf>
- [6] Ames BN, Whitfield HJ. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*. *Quant Biol* 1966;23:221–5.
- [7] Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Hollaender A, editor. *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*. 1971. p. 267–82 [New York].
- [8] Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, Von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, et al. The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res* 1986;168: 69–240.
- [9] Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Res* 2000;455: 29–60.
- [10] Katzer A, Hockertz S, Buchhorn GH, Loehr JF. *In vitro* toxicity and mutagenicity of CoCrMo and Ti6Al wear particles. *Toxicology* 2003;190:145–54.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLES ORIGINAUX OU DE RECHERCHE

Existe-t-il une relation entre les habitudes alimentaires en Tunisie et le cancer colorectal? Éléments de réponse à partir d'un échantillon de population



Nutrition and colorectal cancer relationship in Tunisian population; beginning an answer

A. Kassab^{a,*}, S. Landolsi^b, A. Miled^a, S. Ben Ahmed^{b,c}, G. Olfa^{b,c}

^a Service de biochimie, hôpital Farhat-Hached, Sousse, Tunisie

^b Unité de recherche oncogénétique clinique, CHU Farhat-Hached, Sousse, Tunisie

^c Service de médecine carcinologique, hôpital Farhat-Hached, Sousse, Tunisie

Reçu le 28 mai 2013 ; accepté le 30 mai 2013

KEYWORDS

Diet;
Colorectal cancer

Summary

Introduction. – In Tunisia, colorectal cancer (CRC) is the first digestive cancer. Many factors can contribute to its development, including food and lifestyle. Our aim is to investigate foods that may increase the risk of its development.

Methods. – Our study was carried out of 100 CRC cases and 100 controls. For each subject, we completed a questionnaire regarding his identification, clinical information, personal and family history, diet and lifestyle before CRC onset. We evaluated blood levels of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9).

Results. – The concentrations of CEA and CA 19-9 were significantly higher in patients with stage IV compared to patients with stages II and III. Patients were less physically active than controls. Tobacco, alcohol, canned vegetables, fresh fruits, starches, sweets, lipids, frying, green tea and coffee consumptions are lower in patients than in controls. However, patients eat more red meat, raw vegetables and black tea than the controls. The consumption of raw vegetables, canned tomato, fresh fruits, starches and sweets showed a significant association with CRC occurrence.

Conclusion. – Our study has to be supported by a statistical approach on bigger samples. Nevertheless, the data suggest that the consumption of tobacco, alcohol, canned vegetables, fresh fruits, starches, sweets, lipids, green tea and coffee may not be risk factors for

* Auteur correspondant. Département de biochimie, faculté de médecine dentaire, 1, avenue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisie.
Adresse e-mail : kassab.asma@laposte.net (A. Kassab).

MOTS CLÉS

Alimentation ;
Cancer colorectal

CRC development; on the contrary, the consumption of red meat, raw vegetables and black tea may be risk factors.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

Introduction. — En Tunisie, le cancer colorectal (CCR) occupe le premier rang des cancers digestifs. De nombreux facteurs peuvent concourir à son développement dont l'alimentation et l'hygiène de vie. Notre but est de chercher les aliments qui pourraient augmenter le risque de son développement.

Méthodes. — Notre étude a porté sur 100 cas de CCR et 100 témoins. Pour chaque sujet, nous avons rempli un questionnaire concernant son identification, renseignements cliniques, antécédents personnels et familiaux, habitudes alimentaires et hygiène de vie avant l'apparition de CCR. Nous avons évalué la concentration sanguine de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) et l'antigène carbohydre 19-9 (CA 19-9).

Résultats. — Les concentrations de l'ACE et du CA 19-9 étaient significativement plus élevées chez les patients ayant un CCR au stade IV comparés aux patients aux stades II et III. Les patients étaient physiquement moins actifs que les témoins. La consommation du tabac, d'alcool, de légumes en conserve, de fruits frais, de féculents, de sucreries, de lipides, de friture, de thé vert et de café était plus faible chez les patients que chez les témoins. Cependant, les patients consommaient plus de viandes rouges, légumes crus et du thé noir que les témoins. La consommation de légumes crus, de tomate en conserve, de fruit frais, de féculents et de sucreries montrent un certain niveau d'association avec la survenue de CCR.

Conclusion. — Notre étude, qui demande à être étayée par une étude statistique sur de nombreux échantillons, suggère que la consommation du tabac, d'alcool, de légumes en conserve, de fruits frais, de féculents, de sucreries, de lipides, du thé vert et du café ne soient pas des facteurs de risques pour le développement du CCR. Conclure que la consommation de viandes rouges, de légumes crus et du thé noir sont des facteurs de risques nécessite que la tendance mise en évidence dans notre étude soit confortée par des études complémentaires.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

En Tunisie, on assiste à une augmentation de l'incidence de cancers colorectaux (CCR) au cours de ces dernières années. Le CCR occupe le premier rang des cancers digestifs dans le monde. Le calcul de l'incidence est difficile en Tunisie en raison de l'absence de registre national de cancer. Cependant, nous disposons de trois registres régionaux : Nord, Centre et sud. Dans le centre, l'incidence standardisée du cancer du colon est de 6,5 sur 10 000 habitants par an chez l'homme et de 6,1 sur 100 000 habitants par an chez la femme [1]. Au fil du temps, il y avait d'importantes tendances à la hausse de +2,6 % (IC 95 %: 0,1 %–5,1 %) et +5,3 % (IC 95 %: 2,7 %–7,9 %) pour les femmes et les hommes, respectivement [2].

Les études d'épidémiologie descriptive et les études expérimentales suggèrent que, parmi les facteurs environnementaux, l'alimentation joue un rôle important dans l'étiopathogénie des CCR. En effet, l'alimentation serait responsable de 30 à 50 % des cas de CCR [3]. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques analytiques ont tenté de préciser quels étaient les facteurs alimentaires intervenant dans la cancérogenèse. Leur connaissance permet de proposer les bases d'une politique de prévention. L'objectif de notre étude est d'investiguer la relation alimentation et survenue de CCR dans un échantillon de la population du centre tunisien.

Patients et méthodes**Population d'étude**

Il s'agit d'une étude cas-témoins portant sur 100 patients atteints de CCR hospitalisés au sein du service de médecine carcinologique de Sousse au CHU Farhat Hached, résidant dans le centre tunisien comparés à 100 témoins de la même région et hospitalisés dans le même environnement hospitalier et indemnes de toute maladie cancéreuse. Les patients et les témoins ont été enquêtés durant la période de 2008 à 2010. Chaque sujet de notre étude a été interrogé suivant un questionnaire qui comprend : l'identification du malade, âge, sexe, origine, niveau d'étude, les antécédents personnels et familiaux, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'activité physique, les habitudes alimentaires et hygiène de vie, la fréquence de consommation d'une liste d'aliments, la consommation de certains médicaments et compléments alimentaires et les renseignements sur la maladie : siège, histologie, stade et facteurs pronostiques.

Paramètres biochimiques

Pour chaque sujet de notre étude, un échantillon de sang a été prélevé dans un tube simple pour la détermination de concentrations de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)

Tableau 1 Répartition de la population selon les données cliniques.

	Patients n = 100	Témoins n = 100
Âge (ans)	57,51 ± 11,69	53,30 ± 11,21
Sexe (%)		
Masculin	41	48
Féminin	59	52
IMC (kg/m ²)	24,62	24,12
Antécédents familiaux (%)		
Oui	20	8
Non	80	92
Stade (%)		
Stade I	0	
Stade II	30,9	
Stade III	27,3	
Stade IV	41,8	
Siège de la maladie selon l'âge (%)	Côlon	Rectum
< 40 (ans)	4	2
40–69 (ans)	40	26
≥ 70 (ans)	10	3

et l'antigène carbohydre 19-9 (CA 19-9). Les concentrations sanguines de l'ACE et du CA 19-9 ont été déterminées par une technique immuno-enzymologique microparticulaire réalisée sur AxSYM (ABBOTT).

Analyse statistique

Nous avons utilisé le logiciel SPSS version 11.0 pour établir les tableaux croisés ; calculer les fréquences, les moyennes de consommation des aliments et l'Odds Ratio (OR) avec son intervalle de confiance à 95 % afin de quantifier l'association entre le facteur de risque et l'incidence de la maladie. Une valeur de la significativité statistique $p < 0,05$ a été considérée statistiquement significative.

Les facteurs étudiés sont le sexe, le niveau d'étude, l'âge (pour neutraliser le rôle de confusion qui pourrait être provoqué par l'âge, cette variable a été ajustée en répartissant les sujets sur trois tranches d'âge ; moins de 40 ans, entre 40–69 ans et 70 ans et plus) les antécédents familiaux (selon la présence ou l'absence de cas de cancer dans la famille de l'individu interrogé) et les habitudes alimentaires et hygiène de vie (l'alimentation, le tabagisme, la consommation d'alcool, l'activité physique).

Résultats

Les caractéristiques épidémiologiques de notre population d'étude sont présentées dans les [Tableaux 1 et 2](#). L'âge des enquêtés varie entre 28 et 90 ans avec une moyenne d'âge de 57,51 ± 11,69 ans pour les patients et de 53,30 ± 11,21 ans pour les témoins. La tranche d'âge la plus représentative de notre échantillonnage est celle de 40 à 69 ans avec 26 % de cancer du rectum et 40 % de cancer du côlon ([Tableau 1](#)). Parmi nos patients, le sexe féminin est prédominant (59 %).

Tableau 2 Répartition en pourcentage de la population d'étude selon le mode de vie.

	Patients	Témoins
Tabac		
Fumeurs	8	14
Non-fumeurs	92	86
Alcool		
Consommateurs ^a	8	12
Non-consommateurs	92	88
Activité physique		
Actifs ^b	32	36
Sédentaires	68	64
Niveau d'étude		
Néant	48	4
Primaire	24	10
Formation secondaire	15	24
Cursus universitaire	4	12

^a À partir d'une consommation de 0,51 g/j d'alcool.

^b À partir d'une activité physique de 1 h/j.

Concernant la corpulence, traduite par l'indice de masse corporelle (IMC), les patients et les témoins présentent une corpulence moyenne normale avec des IMC respectifs de 24,62 kg/m² et 24,12 kg/m² ([Tableau 1](#)). Quarante-vingt pour cent des patients ne possèdent pas d'antécédents familiaux de cancers ([Tableau 1](#)).

Les concentrations de l'ACE et du CA 19-9 étaient significativement élevées chez les patients ayant un CCR au stade IV comparés aux patients aux stades II et III ([Tableau 3](#)).

Le tabagisme, la consommation d'alcool, l'activité physique et l'obésité

Les données concernant le tabagisme, la consommation d'alcool, l'activité physique et l'obésité avant l'apparition du CCR sont présentées dans le [Tableau 2](#). La consommation du tabac est plus faible chez les patients que chez les témoins (8 % vs 14 % ; [Tableau 2](#)). La consommation d'alcool est plus faible chez les patients que les témoins (8 % vs 12 % ; [Tableau 2](#)). Notre étude n'a pas montré d'association entre le tabagisme et la consommation d'alcool avec le risque de CCR. Les patients sont physiquement moins actifs que les témoins. Trente-deux pour cent des patients pratiquent une activité physique à raison d'une heure par jour et ce depuis « toujours » contre 36 % chez les témoins ([Tableau 2](#)). Nous avons trouvé une corrélation entre la survenue de la maladie et la non scolarité ([Tableau 2](#)). Dans notre étude, les patients et les témoins présentent une corpulence normale avec des IMC respectifs de 24,62 kg/m² et 24,12 kg/m².

La consommation de légumes

La consommation moyenne de certains aliments ainsi que les associations alimentation—risque du CCR sont présentées dans le [Tableau 4](#). La fréquence de consommation à raison de plus de trois fois par semaine des légumes (frais, crus, cuits) est plus faible chez les patients que chez les témoins avec

Tableau 3 Concentrations des marqueurs tumoraux chez les patients et les témoins.

	Patients	Témoins	<i>p</i>
ACE (ng/mL)	42,045 ± 22,40	2,7 ± 1,3	0,001
CA19-9 (U/L)	257,751 ± 177,04	20 ± 10	0,001
<i>ACE (ng/mL) selon le stade</i>			
Stade II	5,67		
Stade III	3,9		
Stade IV	140,81		
<i>CA19-9 (U/L) selon le stade</i>			
Stade II	25,07		
Stade III	26,85		
Stade IV	884,03		

Tableau 4 Association entre le risque du cancer colorectal et la consommation moyenne (exprimée en nombre de fois par semaine) de certains aliments.

Aliment	Consommation moyenne par semaine		<i>p</i>	OR
	Patients	Témoins		
Légumes frais	3,42	3,86	0,357	0,69
Légumes en conserve	0,01	0	0,321	0,60
Légumes crus	1,49	0,24	0,009	0,31
Légumes cuits	3,62	5	0,064	0,73
Tomate en conserve	4,64	6,36	0,001	0,56
Fruits frais	4,84	6,52	0,005	0,50
Fruits en conserve	0,04	0	0,320	0,67
Féculents	4,53	8,84	0,000	0,52
Sucreries	3,36	6,16	0,006	0,43
Café	3,90	6,88	0,054	0,72
Thé noir	5,48	4,04	0,226	0,55
Thé vert	1,39	2,40	0,155	0,73
Viandes rouges	1,80	1,78	0,924	0,84
Graisses animales	0,9	1,12	0,562	0,90
Huile d'olive crue	3,84	3,96	0,840	0,36
Huile d'olive cuite	4,71	5,84	0,091	0,74
Huile végétale	2,93	4,94	0,086	0,42
Friture	1,94	2,24	0,530	0,60

OR : Odds Ratio.

41,1 % contre 64 %. En particulier, la consommation moyenne de légumes crus et de tomate en conserve montre une association significative avec la survenue de la maladie. Elle est de 1,49 chez les patients et 0,24 chez les témoins pour les légumes crus et de 4,64 chez les patients et 6,36 chez les témoins pour la tomate en conserve (Tableau 4).

La consommation de fruits

La fréquence de consommation à raison de plus de trois fois par semaine des fruits est plus faible chez les patients que chez les témoins avec 60 % contre 92 %. La consommation moyenne de fruits frais est plus faible chez les patients que chez les témoins (4,64 vs 6,52 ; $p < 0,05$; OR = 0,50). Cette consommation montre une association significative avec la survenue du CCR (Tableau 4).

La consommation de féculents

La fréquence de consommation à raison de plus de trois fois par semaine des féculents et des produits farineux est plus faible chez les patients que chez les témoins (66,6 % vs 100 %). La consommation moyenne des féculents et des produits farineux est plus faible chez les patients que chez les témoins (4,53 vs 8,84 ; $p < 0,05$; OR = 0,52). Cette consommation montre une association significative avec la survenue du CCR (Tableau 4).

La consommation de sucreries

La fréquence de consommation à raison de plus de trois fois par semaine des sucreries est significativement plus faible chez les patients que chez les témoins. La consommation

moyenne des sucres est plus faible chez les patients que chez les témoins (3,36 vs 6,16 ; $p < 0,05$; OR = 0,43). Cette consommation montre une association significative avec la survenue du CCR (Tableau 4).

La consommation de boissons chaudes (café, thé noir et thé vert)

La fréquence de consommation à raison de trois fois par semaine du thé vert et du café est plus faible chez les patients que chez les témoins, 22,61 % vs 48 % pour le thé vert et 45 % vs 68 % pour le café. Cependant, le thé noir est plus fréquemment consommé chez les patients que chez les témoins (64,63 % vs 48 %). Il n'existe aucune association significative entre la consommation de ces boissons chaudes et la survenue du CCR (Tableau 4).

La consommation de viandes rouges

La fréquence de consommation à raison de trois fois par semaine de viandes rouges est plus élevée chez les patients que chez les témoins, 23 % vs 22,4 %. La consommation moyenne de viandes rouges est plus élevée chez les patients que chez les témoins (1,80 vs 1,78 ; $p > 0,05$; OR = 0,84 ; Tableau 4). La consommation de viandes rouges ne montre aucune association significative avec la survenue du CCR.

La consommation de lipides

Les lipides consommés par notre population d'étude sont utilisés pour la cuisson (en sauce, friture...) ou consommés crus et regroupent les graisses animales, l'huile d'olive et les autres huiles végétales. La consommation moyenne de graisses animales est plus faible chez les patients que chez les témoins mais l'association est non significative (0,9 vs 1,12 ; $p > 0,05$; Tableau 4). Aussi, la consommation moyenne de l'huile d'olive crue est plus faible chez les patients que chez les témoins et montre une association non significative (3,84 vs 3,96 ; $p > 0,05$; Tableau 4). De même, la consommation moyenne d'huile d'olive utilisée pour la cuisson est plus faible chez les patients que chez les témoins et montre une association non significative (4,71 vs 5,84 ; $p > 0,05$; Tableau 4). La consommation moyenne d'huile végétale (tournesol, maïs) est plus faible chez les patients que chez les témoins et montre une association non significative (2,93 vs 4,94 ; $p > 0,05$; Tableau 4). La consommation moyenne de friture est plus faible chez les patients que chez les témoins et montre une association non significative (1,94 vs 2,24 ; $p > 0,05$; Tableau 4).

Discussion

Notre étude a révélé une augmentation significative de l'ACE chez les patients aux stades IV comparée aux patients aux stades II et III. De nombreuses études ont montré que la sensibilité de l'ACE varie selon les stades, elle est faible pour les stades précoces et augmente au fur et à mesure que le stade est plus avancé [4]. De même, dans une étude japonaise multicentrique individualisant 610 cancers coliques, le risque relatif de récurrence, associé à une concentration

sérique préopératoire de l'ACE supérieure à 2,2 ng/mL, est évalué à 1,55 ($p = 0,022$) [5]. Selon Al-Shuneigat et al., l'ACE et le CA19-9 sont intéressants à divers stades du CCR ou peuvent servir de facteurs pronostiques [6]. La valeur préopératoire de l'ACE peut être utile, pour distinguer, parmi les patients sans envahissement ganglionnaire, ceux qui sont à haut risque de récurrence.

Le tabagisme

Notre étude n'a pas montré d'association significative entre la consommation de tabac et la survenue du CCR. Nos résultats sont en contradiction avec plusieurs études mettant en évidence l'augmentation du risque de CCR chez les fumeurs. Botteri et al. [7] ont montré que les fumeurs avaient un risque plus élevé de 18 % de développer un CCR par rapport aux individus qui n'ont jamais fumé au cours de leur vie [7]. Les anciens fumeurs ont un risque moindre que les fumeurs actuels, mais plus de risque que ceux qui n'ont jamais fumé [8]. De plus, le tabagisme est associé à un risque plus élevé de développer à la fois des polypes adénomateux et hyperplasiques et une prévalence plus élevée de mutation dans les gènes APC et K-ras [9]. En effet, la nicotine stimule la prolifération cellulaire en inhibant l'apoptose dans les cellules coliques [10].

La consommation d'alcool

Notre étude n'a pas montré d'association significative entre la consommation d'alcool et le risque de CCR sachant que nous avons en considération la consommation d'alcool à partir de 50 g/j. La dernière mise à jour du World Cancer Research Fund (WCRF) sur le CCR montre qu'il existe des preuves convaincantes que la consommation d'alcool est parmi les facteurs qui augmentent le risque de la maladie. Une relation dose-effet significative a été mise en évidence [11]. Le pourcentage d'augmentation du risque a été estimé par le nombre de verres d'alcool consommé par jour. Cette augmentation devient significative dès une consommation moyenne d'un verre par jour [12]. En comparaison avec des non-consommateurs d'alcool ne possédant pas d'antécédents familiaux, le risque relatif de CCR était de 2,80 (IC à 95 % : 2,00–3,91) pour des individus consommant plus de 30 g/j et qui ont des antécédents familiaux.

Le mécanisme d'action de l'alcool semble être lié à ses métabolites, principalement l'acétaldéhyde, un composé mutagène, produit dans la muqueuse rectale par la flore intestinale [13]. L'alcool peut aussi induire une carence en folate dans le côlon et le rectum, en diminuant son absorption [14].

L'activité physique

Dans notre étude, les patients sont physiquement moins actifs que les témoins sachant que nous avons pris en considération la pratique quotidienne d'une heure. En effet, une étude a montré que la pratique d'un exercice physique est associée à une réduction de 25 % du risque de CCR [15]. Sanchez et al. ont montré qu'un mode de vie actif procure des bienfaits aux sujets à risque de CCR [16].

L'activité physique pourrait réduire le risque de CCR de 40–50 % pour les personnes qui se livrent à au moins un niveau modéré d'exercice (par exemple : la marche rapide pendant 3–4 heures par semaine). La même étude a montré que c'est aussi un facteur protecteur significatif pour les personnes obèses et en surpoids [16]. L'activité physique améliore aussi les résultats thérapeutiques chez les patients ayant un CCR sous traitement. Les patients ayant un CCR à un stade avancé (stade II ou III) ont un meilleur pronostic s'ils effectuent quatre heures de marche rapide par semaine, ou l'équivalent en exercice physique [17]. Les données physiopathologiques ont montré que cette diminution peut être expliquée par l'augmentation du transit intestinal diminuant ainsi l'exposition de la muqueuse aux agents carcinogènes. De plus, l'exercice physique intense pourrait augmenter le taux de prostaglandines (PGF) qui inhibe la prolifération cellulaire colique et augmente la motricité intestinale. Aussi, l'exercice physique diminue la concentration d'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor) et augmente la concentration d'IGFBP (Insuline-like Growth Factor binding protein).

L'obésité

Dans notre étude, les patients et les témoins présentent une corpulence normale avec des IMC respectifs de 24,62 kg/m² et 24,12 kg/m². Selon Sikalidis et Varamini, l'obésité augmente le risque du CCR de façon dose-dépendante [18]. Les études montrent en plus un risque élevé de tumeurs avec une obésité de type abdominal [19]. Les mécanismes invoqués sont liés au fait que l'obésité augmente la réponse inflammatoire, la résistance à l'insuline et l'hyperleptinémie [20].

La consommation de légumes

Dans notre étude, les patients sont moins consommateurs de légumes que les témoins. Notre étude a montré une association significative pour la consommation des légumes crus. Nos résultats ne suggèrent pas un effet protecteur des légumes crus bien qu'ils possèdent un effet potentiellement protecteur qui revient à leur richesse en fibres. La méta-analyse des données des études de cohorte a montré une diminution de risque de CCR de 10 % pour une consommation de 10 g/jour [11]. Murphy et al. ont montré qu'un régime riche en fibres est inversement associé au risque de CCR et pourrait jouer un rôle préventif contre le CCR [21]. Ceux-ci seraient protecteurs en accélérant le transit digestif, en diluant le contenu colique et en diminuant ainsi le temps de contact des produits mutagènes avec la muqueuse colique.

La consommation de fruits

Dans notre étude, la consommation de fruits frais est significativement plus faible chez les patients que chez les témoins. Cela pourrait suggérer leur effet protecteur. Nos résultats concordent avec plusieurs études [11]. Les fruits sont une source de vitamine C et autres antioxydants, tels que les caroténoïdes, les phénols, et flavonoïdes, ainsi que

d'autres composés phytochimiques protecteurs contre le risque du CCR [11].

La consommation de féculents

Dans notre étude, la consommation des féculents est significativement plus faible chez les patients que chez les témoins. La plupart des études cas-témoins réalisées dans les pays occidentaux font apparaître une relation positive entre la consommation de produits céréaliers raffinés et risque de CCR. Selon ces études, il y a un risque accru avec la consommation de pâtes, de riz, de pain, de céréales et pâtisseries [22]. Les mécanismes évoqués pour expliquer cette association comportent en particulier l'hyperinsulinisme.

La consommation de sucreries

Dans notre étude, la consommation de sucreries est significativement plus faible chez les patients que chez les témoins. Les études épidémiologiques restent controversées sur la relation entre la consommation de sucres et le risque du CCR. Gingras et al. ont montré qu'un régime riche en sucres est étroitement associé à un risque accru de CCR [22]. Les mécanismes qui sont liés principalement à l'hyperinsulinémie peuvent expliquer l'effet des sucres sur le risque du CCR [23]. Les récepteurs à l'insuline et au facteur de croissance d'insuline (IGF-I) sont fortement exprimés par les cellules coliques cancéreuses. L'insuline peut donc se lier à ces récepteurs et favoriser leur croissance.

La consommation de boissons chaudes (café, thé noir et thé vert)

Dans notre population d'étude, les patients sont moins consommateurs de thé vert et de café que les témoins et inversement pour la consommation du thé noir. Récemment, un grand nombre d'études ont attribué un effet protecteur aux polyphénols du thé et du café [24,25]. Les composés polyphénoliques ont été décrits pour inhiber le développement du cancer et sa propagation et utilisés comme agents de chimioprévention. Les effets protecteurs du thé sont également dus à sa richesse en flavonols, catéchines et théaflavines. Ces composés peuvent exercer leur protection contre le CCR en augmentant la motilité du côlon et le statut antioxydant.

La consommation de viandes rouges

Dans notre étude, les patients consomment plus de viandes rouges que les témoins. Nos résultats ne montrent pas d'association significative entre la consommation de viandes rouges et la survenue du CCR. Les méta-analyses des données des études de cohorte montrent une augmentation de 43 % du risque du CCR pour une consommation quotidienne et de 15 % pour une consommation hebdomadaire de 50 g de viande rouge [11]. En effet, l'hème présent dans les viandes rouges catalyse la peroxydation lipidique pour former d'aldéhydes cytotoxiques et génotoxiques. De plus, la consommation de la viande rouge augmente la formation de « Apparent Total Nitroso Compounds » dans les fèces

[26]. Ces composés sont des agents mutagènes et forment des adduits à l'ADN spécifiques aux composés nitrosés au niveau des cellules de la muqueuse colique [27]. De plus, la forte cuisson de la viande rouge provoque la formation d'amines hétérocycliques et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques [28]. Ces composés sont mutagènes et cancérigènes et peuvent agir au niveau de la muqueuse colique.

La consommation de lipides

Pour toutes les formes de lipides étudiés dans notre population (huile d'olive crue, huile d'olive cuite, autre huile végétale, graisses animales), les patients sont moins consommateurs de ce groupe d'aliments que les témoins. L'hypothèse que les graisses sont impliquées dans le CCR a été l'une des premières émises. Le WCRF estime que les études sur la relation entre la consommation de graisses et le risque du CCR ne prouvent pas que les graisses soient une cause du risque du CCR [11]. Les prostaglandines PGE₂, formé à partir de l'acide arachidonique dans la muqueuse colique induit l'expansion cellulaire de crypte colique et la formation subséquente d'adénomes [29]. De plus, les matières grasses ajoutées (beurre, crème...) sont particulièrement riches en acides gras saturés. Ces lipides stimulent le relargage des acides biliaires dont 95% sont réabsorbés. Les 5% restants sont métabolisés par la flore intestinale. Cette dernière intervient dans la transformation des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires souvent toxiques [30].

Conclusion

Notre étude, étayer par des études statistiques sur des échantillons plus importants vu le nombre de paramètres étudiés, a montré que la consommation du tabac, d'alcool, des féculents, des sucreries, des lipides, du thé vert et du café ne seraient pas des facteurs de risques pour le développement du CCR ; au contraire, la consommation des viandes rouges et du thé noir pourraient être des facteurs de risques.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Gharbi O, Chabchoub I, Limam S, Hochlef M, Ben Fatma L, Landolsi A, et al. Facteurs pronostiques et survie des cancers colorectaux métastatiques au CHU de Sousse (Tunisie) : étude comparative de deux périodes de traitement de 200 patients. *Bull Cancer* 2010;4:445–51.
- [2] Missaoui N, Jaidaine L, Abdelkader AB, Trabelsi A, Mokni M, Hmissa S. Colorectal cancer in Central Tunisia: increasing incidence trends over a 15-year period. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:1073–6.
- [3] Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk. *Nutr Clin Pract* 2012;27(5):613–23.
- [4] Svobodova S, Topolcan O, Holubec Jr L, Levy M, Pecan L, Svachina S. Parameters of biological activity in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2011;31:373–8.
- [5] Chen CC, Yang SH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, et al. Is it reasonable to odd preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* 2005;124(2):169–74.
- [6] Al-Shuneigat JM, Mahgoub SS, Huq F. Colorectal carcinoma: nucleosomes, carcinoembryonic antigen and ca 19-9 as apoptotic markers; a comparative study. *J Biomed Sci* 2011;18(1):50.
- [7] Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2008;134(2):388–95.
- [8] Winkels RM, Botma A, Van Duijnhoven FJ, Nagengast FM, Kleibeuker JH, Vasen HF, et al. Smoking increases the risk for colorectal adenomas in patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2012;142(2):241–7.
- [9] Martínez F, Fernández-Martos C, Quintana MJ, Castells A, Llombar A, Iñiguez F, et al. APC and KRAS mutations in distal colorectal polyps are related to smoking habits in men: results of a cross-sectional study. *ClinTransl Oncol* 2011;13(9):664–71.
- [10] Cucina A, Dinicola S, Coluccia P, Proietti S, D'Anselmi F, Pasqualato A, et al. Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J Surg Res* 2012;178(1):233–41.
- [11] World Cancer Research Fund (WCRF)/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR; 2007.
- [12] Pérez-Cueto FJ, Verbeke W. Consumer implications of the WCRF's permanent update on colorectal cancer. *Meat Sci* 2012;90(4):977–8.
- [13] Seitz HK, Stickel F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr* 2010;5(2):21–8.
- [14] Nystrom M, Mutanen M. Diet and epigenetics in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2009;15:257–63.
- [15] Wolin KY, Tuchman H. Physical activity and gastrointestinal cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2011;186:73–100.
- [16] Sanchez NF, Stierman B, Saab S, Mahajan D, Yeung H, Francois F. Physical activity reduces risk for colon polyps in a multiethnic colorectal cancer screening population. *BMC Res Notes* 2012;5:312.
- [17] Halle M, Schoenberg MH. Physical activity in the prevention and treatment of colorectal carcinoma. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106(44):722–7.
- [18] Sikalidis AK, Varamini B. Roles of hormones and signaling molecules in describing the relationship between obesity and colon cancer. *Pathol Oncol Res* 2011;17(4):785–90.
- [19] Botma A, Nagengast FM, Braem MG, Hendriks JC, Kleibeuker JH, Vasen HF, et al. Body mass index increases risk of colorectal adenomas in men with Lynch syndrome: the GEOLynch cohort study. *J Clin Oncol* 2010;28(28):4346–53.
- [20] Payer J, Jackuliak P, Nagyová M. Obesity and a risk of carcinoma. *Vnitr Lek* 2010;56(10):1082–7.
- [21] Murphy N, Norat T, Ferrari P, Jenab M, Bueno-de-Mesquita B, Skeie G, et al. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *PLoS One* 2012;7(6):e39361.
- [22] Gingras D, Béliveau R. Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications. *Cancer Microenviron* 2011;4(2):133–9.
- [23] Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am J Clin Nutr* 2007;86(3):s836–42.
- [24] Kim M, Murakami A, Miyamoto S, Tanaka T, Ohigashi H. The modifying effects of green tea polyphenols on acute colitis and inflammation-associated colon carcinogenesis in male ICR mice. *Biofactors* 2010;36:43–51.
- [25] Pérez-Jiménez J, Fezeu L, Touvier M, Arnault N, Manach C, Hercberg S, et al. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. *Am J Clin Nutr* 2011;93(6):1220–8.

- [26] Hebels DG, Sveje KM, de Kok MC, van Herwijnen MH, Kuhnle GG, Engels LG, et al. Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon. *Food Chem Toxicol* 2012;50(2):95–103.
- [27] Bougnoux P, Menanteau J. Dietary fatty acids and experimental carcinogenesis. *Bull Cancer* 2000;92:685–96.
- [28] Eichholzer M, Rohrmann S, Barbir A, Hermann S, Teucher B, Kaaks R, et al. Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012;3(2): 96–106.
- [29] Djuric Z. The Mediterranean diet: effects on proteins that mediate fatty acid metabolism in the colon. *Nutr Rev* 2011;69(12):730–44.
- [30] Monte MJ, Marin JJ, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009;15(7):804–16.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



STRATÉGIES D'EXPLORATION FONCTIONNELLE ET DE SUIVI THÉRAPEUTIQUE

Les thrombopénies foétales et néonatales alloimmunes

Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia

G. Bertrand, C. Kaplan*

Immunologie plaquettaire, INTS, 6, rue Alexandre-Cabanel, 75015 Paris, France

Reçu le 17 avril 2013 ; accepté le 20 avril 2013

KEYWORDS

Thrombocytopenia;
Alloimmunization;
Fetus;
Newborn;
IVIg

MOTS CLÉS

Thrombopénie ;
Alloimmunisation ;
Fœtus ;
Nouveau-né ;
IgIV

Summary Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia may be regarded as the platelet counterpart of hemolytic disease of the fetus and newborn. The most feared complication of this syndrome is the occurrence of intracranial hemorrhage leading to death or neurological sequels. With advances in the diagnosis and management of the index case and of pregnancies at risk, the prognosis of affected infants has improved. Further research must focus on the mechanisms of maternal sensitization and development of specific therapy. Collaborative and large-scale studies are necessary.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Les thrombopénies foétales et néonatales alloimmunes, équivalents plaquettaires de la maladie hémolytique du nouveau-né, ne sont pas des évènements rares. En cas de thrombopénie sévère, la survenue d'hémorragie intracrânienne altère le pronostic avec risque de décès ou séquelles neurologiques graves. La prise en charge thérapeutique du cas index et des grossesses futures dépend donc du diagnostic biologique amélioré par le développement de techniques de laboratoire de plus en plus sensibles et fiables. Des études collaboratives sont nécessaires afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'immunisation maternelle et de mettre en œuvre un dépistage adéquat, un traitement spécifique, voire une éventuelle prévention.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Les thrombopénies foétales et néonatales alloimmunes résultent de l'immunisation maternelle vis-à-vis des antigènes plaquettaires foétaux que la mère ne possède pas. La destruction des plaquettes foétales est due au passage transplacentaire des anticorps maternels spécifiquement

antiplaquettaires [1]. De ce fait, ce syndrome a longtemps été considéré comme étant la contrepartie plaquettaire de la maladie hémolytique du nouveau-né, cependant l'atteinte est souvent observée dès la première grossesse [2,3].

Depuis les premières descriptions de cette pathologie dans les années 1950 [1,4], des progrès notables ont été réalisés à la fois dans la compréhension du mécanisme physiopathologique, dans le diagnostic biologique

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : drckaplan@free.fr (C. Kaplan).

et dans la prise en charge des patients. Cependant, un certain nombre de questions ne sont pas résolues à ce jour.

La thrombopénie alloimmune est la cause la plus fréquente des thrombopénies sévères chez le fœtus [5] et des thrombopénies néonatales d'apparition précoce chez les nouveau-nés en maternité [6]. La complication majeure de cette atteinte est l'hémorragie intracrânienne en cas de thrombopénie sévère entraînant le décès ou des séquelles neurologiques. Les progrès diagnostiques et thérapeutiques ont modifié le pronostic des enfants atteints. La nature alloimmune de cette thrombopénie ne sera affirmée que par les examens de laboratoire mettant en évidence à la fois l'incompatibilité antigénique entre la mère et l'enfant et la présence chez la mère d'alloanticorps spécifiquement antiplaquettaires.

Incidence de la thrombopénie fœtale ou néonatale alloimmune

La thrombopénie néonatale est fréquente chez les nouveau-nés hospitalisés en réanimation (30 % des cas), les causes étant multiples.

Cependant, une étude prospective a mis en évidence que 0,9 % des nouveau-nés en maternité étaient thrombopéniques et que cette thrombopénie était d'origine immune dans environ un tiers des cas [6]. Chez les caucasiens, l'incidence des thrombopénies fœtales et néonatales est d'un cas pour 800 à un pour 2000 naissances [7]. Le diagnostic peut être méconnu en cas de thrombopénie asymptomatique en l'absence de numération plaquettaire systématique chez le nouveau-né ou de dépistage d'immunisation chez la femme enceinte.

Lors de grossesses successives, la récurrence de l'atteinte est d'environ 100 % pour tout fœtus incompatible avec sa mère, avec une sévérité accrue.

Physiopathologie

Ces thrombopénies sont dues à une immunisation contre les antigènes plaquettaires spécifiques, *human platelet antigen* (HPA). Cette nomenclature, HPA, a été adoptée en 1990 [8]. À ce jour, 27 alloantigènes spécifiquement plaquettaires sont décrits, 12 d'entre eux avec un polymorphisme bi-allélique [9] (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table2.html>). Les études en bioinformatique et biodynamique ont permis d'aborder certains aspects concernant l'antigénicité et l'immunogénicité des polymorphismes antigéniques [10].

La fréquence des antigènes plaquettaires varie suivant les populations [11,12]. Chez les caucasiens, l'antigène HPA-1a est le plus souvent impliqué dans cette pathologie [2], suivi avec une fréquence moindre par l'antigène HPA-5b [13] et l'antigène HPA-3. Chez les Asiatiques, ce sont essentiellement l'antigène HPA-4b et HPA-5b [14] qui sont en cause.

Les techniques plus performantes en sérologie ont permis l'identification d'un nombre croissant de thrombopénies alloimmunes impliquant des antigènes rares ou privés [15–17]. Des études ont permis de mettre

en évidence que ces antigènes de faible fréquence n'étaient pas restreints à des familles uniques [18,19]; c'est ainsi que lorsqu'il y a des résultats négatifs lors des premières investigations biologiques, il est nécessaire de ne pas oublier l'implication potentielle de ces antigènes et d'adapter en conséquence les techniques employées.

Les mécanismes conduisant à l'immunisation maternelle en cours de grossesse, et notamment lors de la première grossesse ne sont pas connus à ce jour. Parmi les hypothèses possibles, la sensibilisation maternelle aux antigènes fœtaux se ferait par l'intermédiaire de la circulation de microvésicules issues du syncytiotrophoblaste [20].

Un terrain immunogénétique semble présider à l'alloimmunisation maternelle. En effet, il a été montré que l'immunisation anti HPA-1a est fréquemment retrouvée chez des femmes homozygotes HPA-1b et HLA-DRB3*01:01 ou DQB1*02:01 [21]. La réponse immune vis-à-vis de l'antigène HPA-5b [22] est aussi associée au complexe majeur d'histocompatibilité, mais l'immunisation vis-à-vis d'autres antigènes plaquettaires n'a pas permis de mettre en évidence des associations particulières, le nombre de cas étant trop faible pour toute analyse statistiquement valable.

Le passage transplacentaire des anticorps maternels IgG est présent dès 14 semaines d'aménorrhée (SA) et les alloantigènes plaquettaires fœtaux sont très bien exprimés dès 18 semaines de grossesse [23]. L'immunisation maternelle vis-à-vis des alloantigènes plaquettaires a été détectée très précocement à six SA chez une femme primigeste, cependant l'immunisation est le plus souvent mise en évidence dès 16 à 20 SA. De ce fait, la thrombopénie fœtale sévère survient précocement [24] et l'hémorragie intracrânienne a pu être documentée avant 20 SA dans plusieurs cas [25].

Le récepteur néonatal, FcRn, molécule apparentée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, joue un rôle important dans le transfert transplacentaire des anticorps maternels. Chez la souris, le rôle du FcRn fœtal a été mis en évidence dans un modèle de thrombopénie fœtale [26].

Les plaquettes fœtales opsonisées par les anticorps maternels sont détruites par le système réticuloendothélial. Les anticorps maternels agissent aussi sur la production plaquettaire, et de ce fait, la thrombopénie résulte de ces deux mécanismes. Si les hémorragies intracrâniennes sont attribuées principalement à la sévérité de la thrombopénie, peu d'études ont été réalisées concernant l'action directe des anticorps antiplaquettaires sur les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et sur l'angiogenèse.

Bien que les plaquettes expriment à leur surface les antigènes HLA de classe I et les antigènes des groupes sanguins, le diagnostic de thrombopénie alloimmune n'est affirmé à ce jour que lorsque les antigènes spécifiquement plaquettaires sont impliqués. La pathogénie des antigènes HLA reste controversée car ces antigènes sont bien moins présents sur les plaquettes que sur d'autres cellules. Quant aux antigènes des groupes sanguins A et B exprimés sur les plaquettes, leur rôle dans cette pathologie n'est absolument pas certain.

Tableau 1 Principales étiologies des thrombopénies néonatales.

Thrombopénie acquise	Immune	Auto-immunité maternelle Alloimmunisation materno-fœtale
	Non immune	Hypoxie Infections bactériennes, virales CIVD
Thrombopénies constitutionnelles	Thrombopathie associée Fonction plaquettaire normale	

Aspects cliniques

La thrombopénie fœtale

Une étude rétrospective effectuée sur des prélèvements de ponctions de sang fœtal a mis en évidence que la thrombopénie alloimmune était la plus sévère des thrombopénies fœtales [5]. Aucune correction spontanée n'est observée en cours de grossesse. Le plus souvent, la thrombopénie fœtale est découverte lors de l'échographie fœtale par des images de ventriculomégalie révélant l'hémorragie intracrânienne. Les hémorragies intracrâniennes peuvent survenir à n'importe quel terme de la grossesse, le plus souvent avant 30 SA. Ces hémorragies ont été observées quel que soit l'antigène en cause. Cependant, elles semblent moins fréquentes lorsque l'antigène HPA-5b est impliqué [27]. Quand une hémorragie intracrânienne est suspectée, il est nécessaire de faire des investigations afin de déterminer s'il y a implication d'une alloimmunisation materno-fœtale. Il sera nécessaire de rechercher attentivement tout antécédent familial de thrombopénie néonatale même modérée et ou transitoire. En cas d'interruption médicale de grossesse, la documentation de la thrombopénie fœtale est essentielle pour la prise en charge des grossesses futures.

En cas d'hémorragie intracrânienne, le pronostic est très réservé, avec décès dans 10 % des cas et séquelles neurologiques dans 20 % des cas (études rétrospectives) [2,28]. C'est en raison de la gravité de ces atteintes et de la récurrence avec aggravation lors des grossesses successives qu'une prise en charge spécifique des grossesses à risque a été développée.

La thrombopénie néonatale

Étant donné qu'actuellement il n'y a pas de dépistage systématique de la thrombopénie alloimmune, le diagnostic est le plus souvent évoqué lorsqu'un nouveau-né à terme naît au terme d'une grossesse normale (absence de thrombopénie maternelle) avec des signes hémorragiques, pétéchies, purpura extensif dans les premières heures de vie, ou moins fréquemment hémorragie viscérale. L'hémorragie intracrânienne peut être présente dès la naissance ou peut survenir pendant toute la phase de thrombopénie sévère. Le diagnostic de thrombopénie alloimmune est suspecté lorsque les autres causes de thrombopénie néonatale sont exclues (Tableau 1). Un examen clinique attentif ne révèle pas d'infection, d'hépatosplénomégalie, d'anomalies du squelette, de dysmorphie en rapport avec

une anomalie chromosomique. En dehors des signes hémorragiques, l'enfant est « bien portant », et la thrombopénie est isolée. Cependant les associations ne doivent pas être méconnues telles que coexistence d'une infection et d'une alloimmunisation, d'une auto-immunité maternelle et alloimmunisation [6]. En cas d'hémorragie, le traitement doit être institué le plus rapidement possible, sans attendre les résultats des examens biologiques.

Dans certains cas, les signes cliniques sont absents et la thrombopénie isolée ne sera révélée que lors d'une numération plaquettaire effectuée dans le cadre d'un bilan pour toute autre cause.

Toute thrombopénie néonatale inexplicée notamment sévère ou d'apparition précoce, dans les 24 à 48 premières heures de vie, aussi bien chez l'enfant prématuré que chez l'enfant à terme doit conduire à des investigations biologiques afin d'affirmer ou d'infirmer le diagnostic d'alloimmunisation materno-fœtale.

Le diagnostic biologique

La thrombopénie est définie chez le fœtus ou chez le nouveau-né comme une numération plaquettaire inférieure à 150 Giga/L [29,30].

La thrombopénie est habituellement isolée, et si l'anémie est présente, elle résulte de l'hémorragie. Dans la grande majorité des cas, la thrombopénie est sévère (inférieure à 50 Giga/L), en particulier lorsque l'antigène HPA-1a est impliqué. Le diagnostic étiologique est important d'une part, pour la prise en charge du cas index et, d'autre part, pour la prise en charge des grossesses futures.

Le diagnostic biologique ne sera affirmé que sur la mise en évidence de l'alloanticorps maternel spécifiquement antiplaquettaire (méthodes sérologiques), l'identification de l'antigène en cause et sa présence chez l'enfant (typage plaquettaire). En raison des difficultés qui peuvent être rencontrées dans ce diagnostic, les examens doivent être réalisés dans un laboratoire spécialisé dans le domaine.

Sérologie

La détection et l'identification des anticorps antiplaquettaires reposent sur des méthodes de type Elisa. Aujourd'hui, la méthode de référence est le Monoclonal antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA) [31], capture antigénique à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris (Fig. 1). Cette méthode est longue et « artisanale » ; toutefois, elle s'avère très sensible et spécifique pour la détection des alloanticorps les plus fréquemment mis en

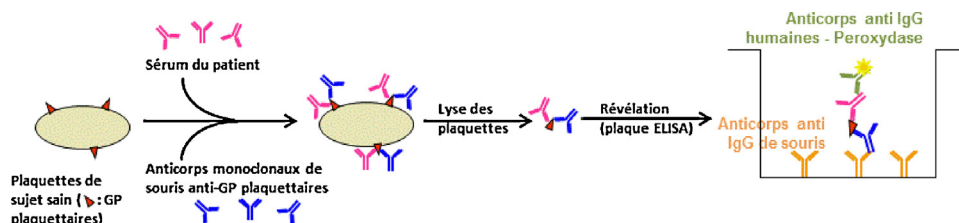


Figure 1 Principe de la méthode Monoclonal antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA) appliquée à la détection des anticorps antiplaquettaires.

cause. La recherche des alloanticorps maternels se fera à partir d'un prélèvement de sérum testé vis-à-vis d'un panel de plaquettes génotypées de groupe O et des plaquettes paternelles (prélèvement sur EDTA). Ces dernières sont indispensables en cas d'implication d'un alloantigène rare. Dans tous les cas, un prélèvement de plaquettes maternelles sera aussi effectué afin de rechercher l'éventuelle présence d'une auto-immunité associée.

Il arrive que certains anticorps de faible affinité et/ou de faible titre soient ainsi difficilement détectables. Cela s'explique par la compétition qui peut se produire entre les anticorps humains et les anticorps monoclonaux, mais également en raison de l'étape de lyse qui peut fragiliser les complexes tri-moléculaires. C'est pourquoi des méthodes Elisa alternatives ont été développées. Le MACE (modified antigen-capture Elisa) est fondé sur la fixation de glycoprotéines plaquettaires sur une microplaque, sans étape de lyse après incubation du sérum. Une autre méthode, le Mixed Passive Haemagglutination (MPHA), est une méthode fondée sur l'incubation du sérum avec des plaquettes intactes, et détection sans étape de lyse. Toutefois, cette méthode ne permet pas une quantification des anticorps détectés.

Typage plaquettaire

Les antigènes plaquettaires présents à la surface des plaquettes sont identifiés par phénotypage ou bien par génotypage. Le phénotypage constitue la méthode la plus fiable, puisque les antigènes potentiellement immunogènes sont directement identifiés. Néanmoins, la rareté des antisérums de référence, ainsi que la quantité importante de plaquettes nécessaires pour le test (incompatible avec une thrombopénie sévère) ont rapidement conduit au développement des méthodes de génotypage fiables et de mise en œuvre rapide. Aujourd'hui, la *polymerase chain reaction-sequence specific primers* (PCR-SSP) est la méthode la plus utilisée en immunologie plaquettaire, même si d'autres méthodes plus anciennes (*PCR-restriction fragment length polymorphism*) ou plus récentes (PCR en temps réel) sont parfois utilisées [32].

Plusieurs études ont démontré l'intérêt de déterminer le typage plaquettaire par des méthodes complémentaires afin d'éviter toute erreur en lien avec un polymorphisme génétique à l'origine de discordance de génotypage [33–36]. La fiabilité du typage plaquettaire sera ainsi meilleure lorsque le phénotypage et le génotypage sont conjointement réalisés, ou bien lorsque deux méthodes de génotypes différentes sont utilisées.

Vers une miniaturisation et une automatisation des analyses

L'accréditation des laboratoires d'analyses médicales conduit à un transfert des méthodes « artisanales » vers des méthodes commerciales certifiées pour le diagnostic in vitro. Cela se traduit par une automatisation des méthodes, et l'introduction de nouvelles technologies en immunologie plaquettaire.

Ainsi, la technologie de puces à billes (« beadchip » BioArray Solutions ; Immucor) utilisée pour le génotypage plaquettaire repose sur :

- une PCR multiplexe au cours de laquelle sont amplifiées plusieurs séquences nucléotidiques portant les polymorphismes plaquettaires ;
- l'identification des polymorphismes par des billes de couleurs portant à leur surface des sondes nucléotidiques ;
- et l'interprétation des données de fluorescence par un logiciel dédié (Fig. 2).

La technologie « Luminex », déjà éprouvée dans le domaine du HLA notamment, est maintenant disponible pour le génotypage plaquettaire (« BloodChip », Progenika). Le génotypage simultané de 11 systèmes antigéniques est réalisé après une PCR suivie d'une révélation par des billes fluorescentes portant à leur surface des sondes nucléotidiques spécifiques de chaque allèle. En sérologie, une trousse de dépistage des alloanticorps antiplaquettaires fondée sur la technologie Luminex sera commercialisée courant 2013 (Gen-Probes). Pour cette application, ce sont les glycoprotéines plaquettaires fixées sur les billes qui permettent l'immuno-capture des anticorps antiplaquettaires.

La détection des anticorps de faible affinité peut être améliorée par l'utilisation de la technologie *surface plasmon resonance* (SPR), comme cela a pu être démontré pour les alloanticorps anti HPA-1a [37,38]. Cette technologie est basée sur la modification de l'angle de réflexion d'un faisceau laser résultant de la fixation d'anticorps humains sur une lame de verre et d'or recouverte de glycoprotéines plaquettaires.

Le traitement

Traitement du nouveau-né

Tout nouveau-né avec signes hémorragiques ou une numération plaquettaire inférieure à 30 Giga/L pendant les

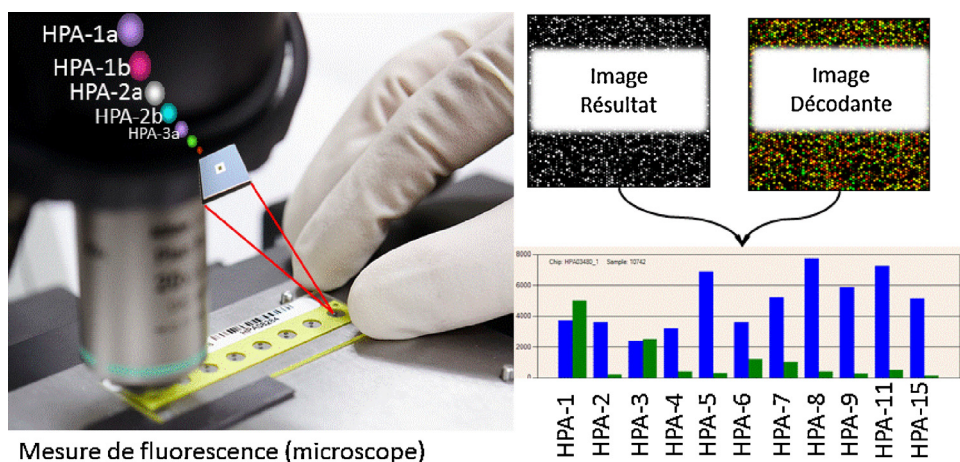


Figure 2 Génotypage plaquettaire par la technologie de puces à billes BioArray (Immucor). Chaque lame contient huit zones de détection, chacune d'elles étant dédiée aux génotypes HPA-1 à -9, -11 et -15 d'un seul individu (soit huit individus/lame au total). Image reproduite avec l'accord du fabriquant.

24 premières heures de vie doit être immédiatement transfusé avec des plaquettes qui ne doivent pas être détruites par l'anticorps maternel, et la mère est le meilleur donneur. Des plaquettes de donneurs génotypés sont aussi disponibles dans certains centres de transfusion. Cependant, en cas d'urgence ou en cas de difficultés logistiques, la transfusion de plaquettes standards [39] avec adjonction d'immunoglobulines intraveineuses est réalisée. Les immunoglobulines intraveineuses protégeraient en partie les plaquettes incompatibles de la destruction rapide par les anticorps. Il faut souligner que les immunoglobulines intraveineuses ne sont en aucun cas une alternative à l'acte transfusionnel ; en effet, l'action des immunoglobulines n'est observée qu'après un délai de 18 heures pendant lequel l'enfant sévèrement thrombopénique reste à risque d'hémorragie.

Lorsqu'une seconde transfusion est nécessaire, les résultats du laboratoire peuvent permettre l'obtention de plaquettes compatibles avec l'anticorps maternel.

Une surveillance sera effectuée jusqu'à obtention d'une numération plaquettaire mettant à l'abri des complications hémorragiques (supérieure à 50 Giga/L). Il sera bien entendu nécessaire de s'assurer de l'absence d'hémorragie intracrânienne même minime.

En l'absence d'hémorragie intracrânienne, l'évolution est favorable rapidement, une numération plaquettaire normale est obtenue en quelques jours.

Si le nouveau-né n'a pas de signe hémorragique ou bien si la numération plaquettaire est supérieure à 30 Giga/L, aucun traitement n'est nécessaire. Cependant, dans ce cas comme après toute transfusion, il est important de surveiller la numération plaquettaire afin de s'assurer qu'elle ne devienne pas inférieure à ce seuil, ce qui impliquerait de mettre en œuvre un traitement comme indiqué ci-dessus.

Une étude récente menée au Royaume-Uni a montré que la thrombopénie néonatale alloimmune était une importante cause de morbidité de mortalité jusqu'à l'âge d'un an, notamment lorsque cette affection n'était pas connue en début de grossesse [40].

Prise en charge des grossesses à risque

Étant donné la récurrence de l'atteinte pour tout fœtus incompatible lors des grossesses successives et l'aggravation habituelle de l'atteinte, une prise en charge des grossesses à risque a été développée depuis plusieurs années [41,42]. Une prise en charge en centre spécialisé est donc recommandée. En cas d'hétérozygotie paternelle pour l'antigène plaquettaire incriminé, le typage plaquettaire fœtal est nécessaire. Ce typage peut être réalisé soit sur cellules amniotiques soit depuis récemment sur l'ADN fœtal présent dans le sang maternel [43].

Différents traitements ont été proposés, transfusion in utero, césarienne précoce, traitement maternel. Actuellement, un consensus existe pour privilégier en première intention un traitement maternel.

Les principales difficultés pour la prise en charge de ces grossesses à risque sont l'évaluation du statut fœtal, l'identification des fœtus nécessitant un traitement et la réponse à ce traitement. Jusqu'à présent, la seule possibilité de connaître le statut fœtal est la ponction de sang fœtal. Cependant, chez un fœtus thrombopénique, le risque de complications n'est pas nul notamment si des transfusions sont associées [44]. Les transfusions plaquettaires sont souvent mal supportées avec bradycardie prolongée menant souvent à des césariennes en urgence. Par ailleurs, les ponctions de sang fœtal peuvent probablement stimuler la réponse immune maternelle. C'est ainsi que des paramètres prédictifs de l'atteinte fœtale ont été recherchés afin de mettre en place une surveillance non invasive. Si des résultats discordants ont été rapportés concernant les significations du titrage de l'anticorps maternel pendant la grossesse, une étude a mis en évidence que le titrage de l'anticorps avant 28 SA, en dehors de tout traitement, réalisé dans des conditions bien standardisées, était corrélé avec une thrombopénie fœtale sévère [45]. Le titrage de l'alloanticorps maternel en cours de grossesse avec traitement semble être aussi un facteur indicatif de l'efficacité thérapeutique [3].

Les protocoles de prise en charge de ces grossesses tendent de plus en plus à réduire tout geste invasif tel que les ponctions de sang fœtal [46]. Actuellement, le traitement proposé est donc la perfusion maternelle d'immunoglobulines intraveineuses polyvalentes (IgIV) à la dose de 1 g/kg par semaine, le début du traitement dépendant des antécédents. Une stratification en fonction du risque est proposée, dépendant de la présence ou non chez l'enfant précédent d'hémorragie intracrânienne [47]. Une étude rétrospective comparant plusieurs traitements maternels, corticoïdes seuls, IgIV seules, et IgIV et addition de corticoïdes, a montré que le traitement le plus efficace était ce dernier [3].

Le protocole thérapeutique proposé actuellement en France est donc l'association d'IgIV et corticoïdes (prednisone 0,5 mg/kg par jour). En cas d'antécédents d'hémorragie intracrânienne, début du traitement par IgIV dès 16 à 18 SA et addition de corticoïdes à partir de 30 à 32 SA. Ce traitement est poursuivi jusqu'à l'accouchement par césarienne à 39 SA.

En cas d'absence d'hémorragie intracrânienne, le traitement débute vers 20 à 22 SA, l'addition de corticoïdes ayant lieu à la même période que précédemment, avec accouchement par césarienne à 39 SA.

À la naissance, une numération plaquettaire de l'enfant sera immédiatement réalisée. En cas de thrombopénie sévère, une transfusion de plaquettes génotypées est immédiatement effectuée.

Il faut souligner que la multiparité et la présence d'hémorragie intracrânienne chez les enfants précédents sont des facteurs de risque d'échec thérapeutique.

Aucun effet délétère n'a été observé dans le développement des enfants après un traitement anténatal par IgIV [48].

Si les protocoles proposés actuellement concernent les femmes ayant eu des antécédents, le problème est posé pour une première grossesse chez une femme potentiellement à risque d'alloimmunisation (sœurs d'une femme ayant donné naissance à un enfant avec une thrombopénie alloimmune, ou bien phénotype plaquettaire à risque découvert lors d'études prospectives). Dans notre expérience, le traitement anténatal n'est proposé que lors de la mise en évidence d'alloanticorps. Aucun geste invasif ne sera effectué.

Autres traitements

D'autres traitements plus spécifiques sont à l'étude, telles que les anticorps monoclonaux [49], ou bien des possibilités d'approche prophylactique si dans certains cas l'alloimmunisation ne survenait qu'après l'accouchement [50].

Dépistage systématique

La plupart des cas de thrombopénie par alloimmunisation materno-fœtale sont découverts à la naissance et donc en l'absence de dépistage systématique, le premier enfant sera toujours à risque de thrombopénie sévère avec des conséquences délétères en cas d'hémorragie intracrânienne. Des études prospectives ont été réalisées mettant en évidence

que le dépistage systématique pouvait être une option de santé publique. Cependant, la mise en place d'un tel programme soulève plusieurs questions dont une sensibilité suffisante dans les tests diagnostiques de mise en évidence de l'immunisation maternelle, l'existence de paramètres maternels prédictifs de l'atteinte fœtale, et l'optimisation de la prise en charge des grossesses à risque.

Conclusion

Des progrès réels ont été accomplis dans ce domaine permettant un meilleur diagnostic et une prise en charge thérapeutique. Cependant, le mécanisme de l'immunisation maternelle n'est toujours pas élucidé et de ce fait, la prévention de l'immunisation n'existe pas. Il est nécessaire dans l'avenir d'établir des études collaborative afin de pouvoir répondre à ces questions. Les modèles animaux sont certes intéressants, cependant, il ne faut pas oublier que la pathologie humaine peut-être fort différente.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. Immunologic mechanisms in neonatal and thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1953;38:433–69.
- [2] Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363–6.
- [3] Bertrand G, Drame M, Martageix C, Kaplan C. Prediction of the fetal status in noninvasive management of alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117:3209–13.
- [4] Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC. A new syndrome of post-transfusion immunologic purpura. *J Clin Invest* 1960;39:1028–9.
- [5] Hohlfeld P, Forestier F, Kaplan C, Tissot JD, Daffos F. Fetal thrombocytopenia: a retrospective survey of 5, 194 fetal blood samplings. *Blood* 1994;84:1851–6.
- [6] Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, Schlegel N, Durand-Zaleski I, Tchernia G, et al. Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: a prospective study. *Blood* 1997;89:4402–6.
- [7] Durand-Zaleski I, Schlegel N, Blum-Boisgard C, Uzan S, Dreyfus M, Kaplan C, et al. Screening primiparous women and newborns for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: a prospective comparison of effectiveness and costs. *Am J Perinatol* 1996;13:423–31.
- [8] von dem Borne AEGKR, Decary F. Nomenclature of platelet specific antigens. *Br J Haematol* 1990;74:239–40.
- [9] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomäki R, et al. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003;85:240–5.
- [10] Jallu V, Poulain P, Fuchs PFJ, plan C, Brevern AG. Molecular dynamics of HPA-1a and -1b polymorphisms: effects on the structure of the b3 subunit of the α IIb β 3 integrin. *PLoS ONE* 2012;7:1–10.
- [11] Halle L, Bach KH, Martageix C, Bianchi F, Lê T, Kim T, et al. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue Antigens* 2004;63:34–40.

- [12] Halle L, Bigot A, Mullen-Imandy G, M'Bayo K, Jaeger G, Anani L, et al. HPA polymorphism in sub-Saharan African populations: Beninese, Cameroonians, Congolese, and Pygmies. *Tissue Antigens* 2005;65:295–8.
- [13] Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, Kiefel V, Schlegel N, Chesnel N, et al. HPA-5b (Bra) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol* 1991;78:425–9.
- [14] Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med* 2004;14:399–408.
- [15] Kroll H, Kiefel V, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. Sra, a private platelet antigen on glycoprotein IIIa associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1990;76:2296–302.
- [16] Jallu V, Meunier M, Brement M, Kaplan C. A new platelet polymorphism Duv(a+), localized within the RGD binding domain of glycoprotein IIIa, is associated with neonatal thrombocytopenia. *Blood* 2002;99:4449–56.
- [17] Jallu V, Bertrand G, Bianchi F, Chenet C, Poulain P, Kaplan C. The alphaIIb p.Leu841Met (Cab3(a+)) polymorphism results in a new human platelet alloantigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2013;53:554–63.
- [18] Bertrand G, Jallu V, Martageix C, Kaplan C. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an update on private and rare human platelet antigens. *Vox Sanguinis* 2012;103:48 [abstract].
- [19] Bertrand G, Bianchi F, Quesne J, Philippe S, Chenet C, Martageix C, et al. A severe case of neonatal thrombocytopenia with a fatal outcome, implicating HPA-12bw fetomaternal platelet alloimmunization. *Transfusion* 2013;53:466–8.
- [20] Kumpel BM, Sibley K, Jackson DJ, White G, Soothill PW. Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GP IIIa, beta 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion* 2008;48:2077–86.
- [21] Valentin N, Vergracht A, Bignon JD, Cheneau ML, Blanchard D, Kaplan C, et al. HLA-DRw52a is involved in alloimmunization against PL-A1 antigen. *Hum Immunol* 1990;27:73–9.
- [22] Semana G, Zazoun T, Alizadeh M, Morel-Kopp MC, Genetet B, Kaplan C. Genetic susceptibility and anti-human platelet antigen 5b alloimmunization. Role of HLA class II and TAP genes. *Hum Immunol* 1996;46:114–9.
- [23] Kaplan C, Daffos F, Forestier F, Cox WL, Lyon-Caen D, Dupuy-Montbrun MC, et al. Management of alloimmune thrombocytopenia: antenatal diagnosis and in utero transfusion of maternal platelets. *Blood* 1988;72:340–3.
- [24] Daffos F, Forestier F, Muller JY, Reznikoff-Etievant MF, Habibi B, Capella-Pavlosky M, et al. Prenatal treatment of alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1984;II:632.
- [25] Giovangrandi Y, Daffos F, Kaplan C, Forestier F, Mac Alleese J, Moiriot M. Very early intracranial haemorrhage in alloimmune fetal thrombocytopenia. *Lancet* 1990;336:310.
- [26] Chen P, Li C, Lang S, Zhu G, Reheman A, Spring CM, et al. Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy. *Blood* 2010;116:3384–6.
- [27] Spencer JA, Burrows RF. Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2001;41:45–55.
- [28] Kaplan C, Daffos F, Forestier F, Morel MC, Chesnel N, Tchernia G. Current trends in neonatal alloimmune thrombocytopenia diagnosis and therapy. In: Kaplan-Gouet C, Schlegel N, Salmon C, Mac Gregor J, editors. *Platelet immunology: fundamental and clinical aspects*. Paris: John Libbey-Eurotex/ed.INSERM; 1991. p. 267–78.
- [29] Forestier F, Daffos F, Galacteros F, Bardakjian J, Rainaut M, Beuzard Y. Hematological values of 163 normal fetuses between 18 and 30 weeks of gestation. *Pediatr Res* 1986;20:342–6.
- [30] Pahal GS, Jauniaux E, Kinnon C, Thrasher AJ, Rodeck CH. Normal development of human fetal hematopoiesis between eight and seventeen weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1029–34.
- [31] Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987;70:1722–6.
- [32] Bertrand G, Kaplan C. Génotypage en immunologie plaquettaire: quand? Comment? Limites. *Transfus Clin Biol* 2009;16:169.
- [33] Bertrand G, Bianchi F, Chenet C, Martageix C, Blanchet P, Baumler M, et al. New mutation in the platelet b3-integrin gene: implication for the diagnosis of fetomaternal alloimmunization. *Transfusion* 2006;46:2138–41.
- [34] Bertrand G, Kaplan C. The 262T>C silent mutation of the platelet b3-integrin gene is not restricted to a single family. *Transfusion* 2008;48:402.
- [35] Bertrand G, Kaplan C, Kennel A, Perrier P, Moncharmont P. New mutation in the beta 3-integrin (GP1IIa) gene inducing HPA-1 genotyping discrepancies. *Transfusion* 2010;50:1589–91.
- [36] Bertrand G, Jallu V, Beranger T, Bianchi F, Casale C, Dufour V, et al. HPA-5 typing discrepancy reveals an Ile503Leu substitution in platelet GPIa (alpha2 integrin). *Vox Sang* 2013, <http://dx.doi.org/10.1111/vox.12019> [Sous presse].
- [37] Peterson JA, Kanack A, Nayak D, Bougie DW, McFarland JG, Curtis BR, et al. Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. *Transfusion* 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.x.03903> [Sous presse].
- [38] Bakchoul T, Bertrand G, Krautwurst A, Kroll H, Bein G, Sachs UJ, et al. The implementation of surface plasmon resonance technique in monitoring pregnancies with expected fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/trf.12051> [Sous presse].
- [39] Kiefel V, Bassler D, Kroll H, Paes B, Giers G, Ditomasso J, et al. Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood* 2006;107:3761–3.
- [40] Knight M, Pierce M, Allen D, Kurinczuk JJ, Spark P, Roberts DJ, et al. The incidence and outcomes of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: a UK national study using three data sources. *Br J Haematol* 2011;152(4):460–8.
- [41] Kaplan C, Murphy MF, Kroll H, Waters AH. Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: antenatal therapy with IVIgG and steroids—more questions than answers. *Br J Haematol* 1998;100:62–5.
- [42] Bussel JB, Berkowitz RL, McFarland JG, Lynch L, Chitbara N. Antenatal treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1988;319:1374–8.
- [43] Le Toriellec E, Chenet C, Kaplan C. Safe fetal platelet genotyping: new developments. *Transfusion* 2012, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03954.x> [Sous presse].
- [44] Paidas MJ, Berkowitz RL, Lynch L, Lockwood CJ, Lapinski R, McFarland JG, et al. Alloimmune thrombocytopenia: fetal and neonatal losses related to cordocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:475–9.
- [45] Bertrand G, Martageix C, Jallu V, Vitry F, Kaplan C. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2006;4:628–37.
- [46] Rayment R, Brunskill SJ, Soothill PW, Roberts DJ, Bussel JB, Murphy MF. Antenatal interventions for fetomaternal

- alloimmune thrombocytopenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;5:CD004226.
- [47] Pacheco LD, Berkowitz RL, Moise Jr KJ, Bussel JB, McFarland JG, Saade GR. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a management algorithm based on risk stratification. *Obstet Gynecol* 2011;118:1157–63.
- [48] Radder CM, Roelen DL, van de Meers-Prins EMW, Claas FHJ, Kanhai HHH, Brand A. The immunologic profile of infants born after maternal immunoglobulin treatment and intrauterine platelet transfusions for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:815–20.
- [49] Ghevaert C, Wilcox DA, Fang J, Armour KL, Clark MR, Ouwehand W, et al. Developing recombinant HPA-1a-specific antibodies with abrogated Fcγ receptor binding for the treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *J Clin Invest* 2008;118:2929–38.
- [50] Tiller H, Killie MK, Chen P, Eksteen M, Husebekk A, Skogen B, et al. Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion* 2012;52:1446–57.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



STRATÉGIES D'EXPLORATION FONCTIONNELLE ET DE SUIVI THÉRAPEUTIQUE

Les examens biologiques au cours des fièvres prolongées et récurrentes

The role of biomarkers in patients with fever of unknown origin and recurrent fever

S. Mattioni, G. Grateau*

Service de médecine interne, centre de référence des amyloses d'origine inflammatoire et de la fièvre méditerranéenne familiale, université Paris-6, hôpital Tenon, Assistance publique—Hôpitaux de Paris, 4, rue de la Chine, 75970 Paris cedex 20, France

Reçu le 22 avril 2013 ; accepté le 24 avril 2013

KEYWORDS

Biomarker;
Fever of unknown origin;
Recurrent fever;
Auto-inflammatory diseases

MOTS CLÉS

Marqueur biologique ;
Fièvre ;
Fièvre prolongée inexpliquée ;
Fièvre récurrente ;
Maladie auto-inflammatoire

Summary Fever of unknown origin (FUO) are defined by a fever greater than 38.3 °C evolving during at least 3 weeks and without diagnosis despite appropriate explorations. This clinical entity is not so uncommon. More than 200 causes of FUO have been reported. Despite medical advances, they remain unexplained in 10 to 30% of cases after exhaustive work-up. So FUO is a challenging medical problem. Clinical evaluation remains the basis of the initial evaluation of the patient with FUO. Newer diagnostic modalities, including blood chemistry, immunological tests and molecular methods have important role in the assessment of these patients. We will discuss in this review terminology, common causes of FUO and technical innovation.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé Les fièvres prolongées inexpliquées se définissent comme une fièvre supérieure à 38,3 °C évoluant depuis trois semaines et sans diagnostic malgré des explorations appropriées. Ces fièvres relèvent de causes diverses et nombreuses (plus de 200 répertoriées). Elles restent inexpliquées dans 10 à 30 % des cas malgré un inventaire exhaustif et les progrès des techniques de biologie. Elles relèvent d'un véritable défi diagnostique pour les cliniciens. Si l'examen clinique reste un élément essentiel dans la prise en charge de ces malades et oriente le choix des examens complémentaires, ces fièvres ont bénéficié des importants progrès réalisés dans différents domaines de la biologie : examens biochimiques, immunologie, techniques de biologie moléculaire en microbiologie, diagnostic génétique. Dans cet article nous traiterons des fièvres prolongées inexpliquées ainsi que des fièvres récurrentes. Après avoir rappelé la terminologie et les différentes causes de ces fièvres, nous passerons en revue les innovations techniques qui sont intervenues ces dernières décennies.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : gilles.grateau@tnn.aphp.fr (G. Grateau).

Introduction

Si la plupart des épisodes de fièvre sont courts et relèvent soit d'infections bénignes ne nécessitant ni examens complémentaires, ni traitement spécifique, soit de maladies plus graves devant être rapidement prises en charge, certaines fièvres sont à la fois de durée prolongée et difficiles à diagnostiquer. Il s'agit des fièvres persistantes inexpliquées (FPI) (dans la littérature anglo-saxonne : *fever of unknown origin* [FUO]) [1]. Cette thématique mérite notre attention car cette situation n'est pas exceptionnelle (elle concerne 2,9% des patients hospitalisés) [2] et, ces fièvres, restent malgré les progrès des techniques de biologie et d'imagerie un défi pour les médecins ayant en charge ces patients. Nous aborderons dans une première partie les fièvres prolongées inexpliquées et dans une seconde nous nous intéresserons à un sous-groupe de celles-ci : les fièvres intermittentes. Dans chacune de ces deux parties nous envisagerons les causes et les outils biologiques à notre disposition pour mieux appréhender les différentes entités diagnostiques.

Fièvres prolongées inexpliquées

Définitions et terminologie

La première définition formelle ayant recueilli un large assentiment est celle proposée par Petersdorf et Beeson dans une revue de 100 cas parue dans *Medicine* en 1961 [3]. Il s'agit d'une température supérieure à 38,3 °C, contrôlée à plusieurs reprises, persistant depuis au moins trois semaines et sans diagnostic à l'issue d'au moins une semaine d'investigations dans le cadre d'une hospitalisation. Cette définition en raison d'une modification des pratiques cliniques, du nombre croissant d'immunodéprimés, de l'accessibilité d'un plus grand nombre d'examens en ambulatoire a évolué [1]. Ainsi en 1991, Durack et Street vont ramener la durée d'exploration au sein d'un service hospitalier à trois jours ou à trois visites externes au cours desquelles sont réalisées les explorations appropriées [4]. Par ailleurs, ils vont individualiser les FPI en cinq sous-groupes (qui relèvent de causes et de prises en charge

différentes) : fièvres persistantes d'origine inconnue classiques (seules abordées dans cet article), FUO associées aux soins, FUO chez l'immunodéprimé (neutropénique), FUO associée au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [4,5]. Il faut souligner que ces critères assez largement utilisés ne sont néanmoins pas repris par toutes les études [4].

Étiologie

Plus de 200 causes différentes ont été répertoriées [2]. On les classe en cinq grandes catégories : maladies infectieuses, maladies inflammatoires non infectieuses (MINI), néoplasiques, diverses et sans diagnostic au terme des explorations [5]. Les principales causes sont listées dans le [Tableau 1](#). Au cours du temps, on constate une diminution des causes néoplasiques et infectieuses au profit des MINI et des cas non diagnostiqués. La [Fig. 1](#) présente les résultats de la revue de la littérature de Mourad et al. qui a repris 11 séries parues entre janvier 1966 et décembre 2000 et regroupant 1000 patients dont les données ont été collectées entre 1952 et 1994 [2]. Ces tendances sont confirmées dans les séries récentes [5,6]. Cela est lié aux progrès de l'imagerie et des techniques de microbiologie qui conduisent à un diagnostic plus rapide des maladies néoplasiques et infectieuses (avant qu'elles ne puissent répondre aux critères de FPI) [2,4]. Par ailleurs, les critères diagnostiques sont actuellement plus exigeants ; les diagnostics d'infections virales, bactériennes nécessitent des critères microbiologiques stricts, les diagnostics syndromiques tels que les hépatites granulomateuses, les syndromes d'activation macrophagique constituent des orientations diagnostiques mais ont disparu des classifications étiologiques, les critères exigés pour retenir des diagnostics tels que ceux de maladie de Still, de pseudo-polyarthrite rhizomélisque sont également plus rigoureux [4,7].

Stratégie diagnostique

Il n'existe pas d'algorithme consensuel et validé des investigations à pratiquer et de leur séquence.

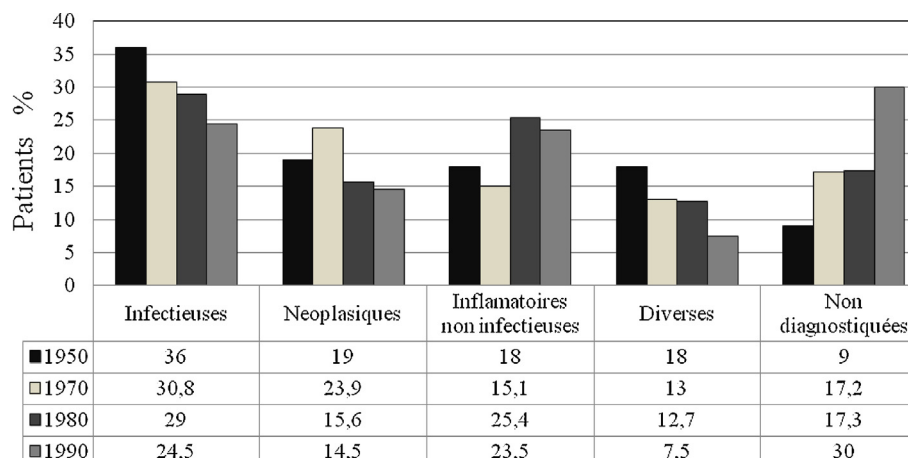


Figure 1 Évolution des causes de fièvres persistantes inexpliquées entre les années 1950 et 1990.

Tableau 1 Étiologie des fièvres persistantes.

Infectieuses	Bactérienne : abcès, prostatite, endocardite, tuberculose, fièvre Q, bartonellose... Virale : EBV, CMV, hépatites, VIH Parasitaire : toxoplasmose, trichinose... Fongique (concerne surtout les immunodéprimés)	25–40 %
Néoplasiques	Hémopathies (2/3) : lymphome non hodgkinien, maladie de Hodgkin, syndromes myéloprolifératifs... Tumeurs solides (1/3) : rénale, colique, pancréatique, cérébrale, carcinome hépatocellulaire, sarcomes	15–30 %
Maladies inflammatoires non infectieuses	Maladie de Still de l'adulte Maladie de Horton, PPR Lupus érythémateux disséminé Angéite nécrosante Maladies granulomateuses (sarcoïdose, maladie de Crohn) Fibrose rétropéritonéale, maladie de Takayasu...	10–30 %
Causes diverses	Affection vasculaire : résorption d'un hématome (rechercher des signes d'hémolyse), anévrysme fissuré, maladie thromboembolique, myxome Endocrinopathie : thyroïdite et hyperthyroïdie (le plus souvent), pathologie surrénalienne (plus exceptionnelle), traitement par progestatif Fièvre médicamenteuse et fièvre professionnelle Hépatite alcoolique subaiguë Syndromes hémolytiques Pathomimie : fièvre factice et autoprovoquée Lésion hypothalamique Dysrégulation thermique autonome...	5–15 %
Non retrouvées		10–30 %

La première étape consiste en un examen clinique et un interrogatoire fouillé et répété. Cette étape est essentielle. Dans une étude prospective menée entre 1990 et 1999 par Vanderschueren et al. ayant inclus 290 patients, l'évolution clinique constituait après les biopsies l'élément décisif, contribuant au diagnostic pour 22,9 % des patients [8]. Il est à noter que l'allure de la courbe thermique a donné lieu à de nombreuses descriptions (continue, hectique, ondulante) mais sa pertinence nosologique est faible [1,5] en dehors d'une variété appelée fièvre récurrente (cf. ci-dessous). La dissociation pouls/température peut également constituer une orientation diagnostique en faveur d'une typhoïde, brucellose, légionellose [5].

Examens biologiques

Protéine réactive C (CRP). La CRP a été découverte en 1930. C'est la première protéine de la phase aiguë de l'inflammation ayant été décrite et c'est un marqueur très sensible de l'inflammation systémique [9]. Elle est produite par les hépatocytes en réponse à l'interleukine-6 [10]. Sa cinétique est rapide, sa concentration sanguine (ou sérique) augmente à la sixième heure du processus inflammatoire, le pic de synthèse est atteint à la 48^e heure, sa demi-vie plasmatique est de 19 heures (Fig. 2). Seule l'insuffisance hépatocellulaire peut interférer avec la production de la CRP. Elle est augmentée dans de nombreuses situations : en cas d'infections bactériennes, fongiques systémiques, virales ; dans de nombreuses maladies inflammatoires et auto-inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, maladie de Crohn, fièvre

méditerranéenne familiale, vascularites systémiques...); nécroses tissulaires (infarctus du myocarde, pancréatite aiguë); traumatismes (fractures, brûlure, chirurgie); néoplasie. La CRP, bien que n'étant pas un biomarqueur spécifique d'infection bactérienne reste néanmoins très utile pour dépister une maladie organique, suivre la réponse au traitement d'une maladie inflammatoire ou infectieuse. Enfin, on note qu'il existe quelques maladies inflammatoires ne s'accompagnant pas d'augmentation de la CRP, à savoir, le lupus érythémateux disséminé (en dehors des sérites), la sclérodermie, la dermatopolymyosite, la réaction de greffon

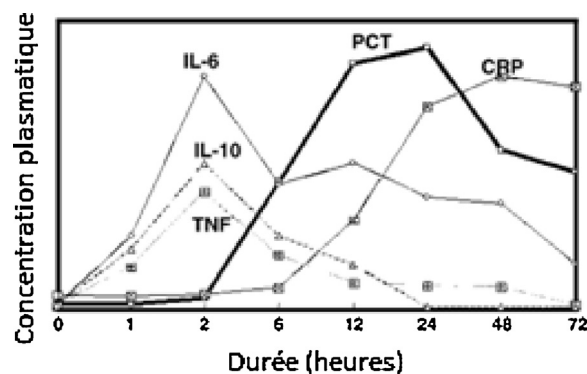


Figure 2 Cinétique de différents marqueurs de l'inflammation après stimulation endotoxinique chez des volontaires sains. CRP : protéine C-réactive, IL : interleukine, PCT : procalcitonine, TNF : *tumor necrosis factor*.

Repris de Reinhart-Meisner Crit Care Med 2006.

contre l'hôte. Dans ces situations, la CRP pourra aider à distinguer une infection intercurrente, d'une poussée de ces maladies [9,11].

Procalcitonine (PCT). La PCT est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation dont le rôle physiologique reste inconnu hormis d'être le précurseur de la calcitonine [12]. La valeur normale de la PCT sérique est inférieure à 0,05 ng/mL. Elle est détectable à partir de la quatrième heure d'une infection, ce qui en fait le marqueur le plus précoce de la phase aiguë, elle présente ensuite un pic entre la sixième et la huitième heure, suivi d'un plateau à la 24^e heure (Fig. 2). Sa demi-vie est d'environ 24 heures. Même si ce test qui a fait l'objet d'une première publication en 1993, a démontré son intérêt pour distinguer, essentiellement chez l'enfant, les infections bactériennes des maladies virales ou inflammatoires, il comporte certaines limites. Tout d'abord l'existence de faux-négatifs, une valeur inférieure à 0,05 ng/mL ne permet pas d'exclure une infection systémique naissante, une infection localisée (et ce même si les nouveaux tests ultrasensibles ont pu améliorer la valeur prédictive négative de la PCT), ou une infection à bactérie intracellulaire [12,13]. Il existe également des faux-positifs : syndrome d'activation macrophagique, maladie de Kawasaki, maladie de Still de l'adulte, patients polytraumatisés et ayant subi des chirurgies lourdes, coups de chaleurs, arrêt cardio-circulatoire ou choc cardiogénique prolongé, en post-transplantation d'organe, fièvre en cas de réaction de l'hôte contre le greffon, carcinome bronchique à petite cellules, tumeurs neuro-endocrines et carcinoïdes, cancer médullaire de la thyroïde, thyroïdite de de Quervain, augmentation physiologique dans les 48 à 72 heures après la naissance, insuffisance rénale préterminale, grands brûlés [11–14]. Malgré l'existence de ces faux-négatifs et positifs, la PCT est le meilleur biomarqueur pour différencier infection bactérienne, d'infection virale et infection bactérienne, d'inflammation d'origine non infectieuse. Dans une méta-analyse parue dans *Clinical Infectious Disease* et regroupant 1386 patients la spécificité de l'élévation de la PCT était de 81 % vs 67 % pour la CRP [10]. La surveillance de la décroissance de ses taux sous antibiotiques permet également de diminuer la durée de ces traitements [12]. S'il y a eu des études visant à évaluer l'intérêt pronostique de la PCT dans le cadre de fièvres inexplicables notamment chez les enfants neutropéniques, il n'y a pas eu d'études équivalentes dans les fièvres prolongées inexplicables au sens de la terminologie classique définie ci-dessus [15].

Éosinopénie. La diminution des polynucléaires éosinophiles sanguins en réponse à une infection a été décrite par Bass dès 1893 [16]. Dans une étude publiée en 2003 et ayant porté sur 138 patients présentant un syndrome inflammatoire défini par une CRP supérieure à 20 mg/L, Gil et al. ont montré qu'en cas d'hyperleucocytose supérieure à 10 000/mm³, si la concentration des éosinophiles est inférieure à 40/mm³, la probabilité d'infection bactérienne est alors de 100 % [17]. A contrario, lorsque la valeur moyenne des éosinophiles est supérieure à 200/mm³, la probabilité d'infection bactérienne (valeur prédictive positive) est de 23 %. Une étude cas-témoin de Wibrow et al. ayant inclus 531 patients confirme que chez les adultes, si la spécificité d'une concentration d'éosinophiles inférieure à 10/mm³ est correcte : 79 % (intervalle de confiance [IC] 95 % : 74–82), la sensibilité quant à elle est faible : 47 % (IC 95 % : 41–52). Par

ailleurs, contrairement aux résultats d'études antérieures, le nombre des éosinophiles chez les enfants ayant une bactériémie et chez les enfants témoins n'étaient pas différents. Pour cet auteur, l'éosinopénie a une valeur d'alerte en faveur d'une bactériémie chez une population adulte, en revanche, l'absence d'éosinopénie ne peut constituer un élément rassurant en défaveur d'une bactériémie. Enfin, il est à rappeler que les éosinophiles peuvent diminuer en cas d'infection virale, de traitement par corticoïdes ou catécholamines, de situation de stress, ou de certaines maladies psychiatriques telles que la dépression et dans quelques cas d'allergies [16].

Ferritine et ferritine glycosylée. Quelques observations à l'instar de celles de Cunha suggèrent qu'une élévation importante (supérieure à 2 fois la normale) et prolongée de la ferritine permet de restreindre le champ des diagnostics évoqués dans le cadre d'une fièvre prolongée. Les diagnostics à évoquer sont alors ceux de cancers solides, hémopathies, syndromes myéloprolifératifs, maladies de système (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Horton, de Still, lupus érythémateux disséminé) et pour ce qui est des causes infectieuses : l'infection par le VIH, par le CMV, la tuberculose [18–20]. La ferritine glycosylée permet également une orientation diagnostique. Elle provient de cellules sénescentes (par cytolysse physiologique) ou est sécrétée par les monocytes/macrophages. Chez le sujet sain, elle constitue 50 à 80 % de la ferritine sérique. Dans les phénomènes inflammatoires aigus, la ferritine est principalement sécrétée sous forme glycosylée, alors que dans les phénomènes de lyse tissulaire, il y a essentiellement un relargage de ferritine tissulaire non glycosylée. Un pourcentage de ferritine glycosylée entre 20 et 40 % s'observe dans les maladies inflammatoires multisystémiques autres que la maladie de Still. Fautrel a montré qu'une ferritine supérieure à 5 fois la normale associée à une ferritine glycosylée inférieure à 20 % a une sensibilité de 43,2 % et une spécificité de 92,9 % pour le diagnostic de maladie de Still de l'adulte. Ainsi la ferritine glycosylée a permis de proposer un nouveau jeu de critères de la maladie de Still, bien que ceux-ci ne soient pas encore totalement validés. Il est également intéressant de noter que si la ferritine se corrige entre les poussées de la maladie, la ferritine glycosylée reste quant à elle diminuée pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois après la poussée [21]. Comme mentionné plus haut ; la diminution de la ferritine glycosylée n'est cependant pas pathognomonique de la maladie de Still. Elle est observée dans d'autres processus inflammatoires : syndrome d'activation macrophagique, infections systémiques sévères, quelques rares cas de néoplasies et certains cas de syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse (DRESS syndrome) [21–26].

Scores combinés. Étant donné les limites de chacun des différents examens biologiques, certains auteurs ont proposé des scores combinés afin d'affiner l'orientation diagnostique. Efstathiou et al. dans une étude ayant analysé 33 variables et inclus 212 patients pris en charge pour des fièvres prolongées inexplicables ont montré qu'une CRP supérieure à 60 mg/dL, une éosinopénie inférieure à 40/mm³, une ferritine inférieure à 500 µg/L sont associées de façon indépendante à une cause infectieuse avec des *odds ratios* respectifs à 6 (IC 95 % : 2,5–9,8), 4,1 (IC 95 % : 2–7,3), 2,5 (IC 95 % : 1,3–5,2). La présence de deux de ces

trois variables permet de prédire une origine infectieuse avec une sensibilité de 91,4 % et une spécificité de 92,3 % [27].

Place de la biologie moléculaire. La biologie moléculaire a révolutionné le diagnostic des maladies infectieuses permettant de mettre en évidence des pathogènes de culture difficile ou non viables du fait d'une antibiothérapie préalable. Les techniques de PCR universelles reposent sur l'amplification des gènes codant l'ARN ribosomal 16S des eubactéries (et 18S des champignons). Le gène codant l'ARN 16S est composé de séquences nucléotidiques conservées chez toutes les bactéries et celles-ci encadrent des séquences plus variables. Ainsi en localisant des amorces (amorces universelles) dans les régions conservées, on peut amplifier par PCR ce fragment d'ADN de n'importe quelle bactérie et le comparer aux séquences compilées au sein de banques de données pour ainsi identifier l'espèce bactérienne. Ce progrès est particulièrement notable dans le cas des endocardites à hémocultures négatives qui représentent 2,5 à 31 % des endocardites. Dans une étude prospective menée entre 2001 et 2009, la réalisation de techniques de PCR ADN 16S et 18S sur le sang total et surtout sur le tissu valvulaire excisé a permis de poser le diagnostic dans respectivement 14 % et 69,1 % des cas [28].

Place des biopsies

En cas de présence d'adénopathie pathologique, on peut réaliser des biopsies ganglionnaires. Celles-ci sont particulièrement rentables pour poser les diagnostics d'hémopathie, toxoplasmosse, maladie de Kikuchi, maladie granulomateuse [4,5]. La ponction biopsie hépatique permet d'obtenir le diagnostic dans 9 à 17 % des cas et est particulièrement utile dans le diagnostic des maladies granulomateuses. En effet l'examen histologique permet différencier entre les atteintes infectieuses (nécrose caséeuse, granulome bilharzien), auto-immunes, néoplasiques. Cependant, cet examen n'est pas dénué de risque (complications rapportées dans 0,06 à 0,32 % des cas) et l'indication est donc à évaluer avec précaution. L'existence d'une hépatomégalie ou de perturbations des tests hépatiques ne sont pas prédictives de la rentabilité diagnostique de cet examen [4,5]. La biopsie ostéomédullaire est un examen important pour les hémopathies, infections à germes intracellulaires (comme l'histoplasmosse disséminée), tuberculose miliaire. Elle est utile au diagnostic dans 10 à 23,7 % des cas. Dans une étude ayant inclus 130 patients avec une fièvre prolongée inexpiquée ayant eu une biopsie ostéomédullaire, Hot et al. ont montré que l'existence d'une anémie ou d'une thrombopénie est prédictive en analyse multivariée d'une plus grande rentabilité de cet examen. Ils ont comparé les groupes de patients selon qu'ils recevaient ou non des corticoïdes et montré que cela n'affectait pas les résultats qu'on pouvait attendre de cet examen [29]. Enfin, dans cette étude et dans d'autres, il a été montré une rentabilité extrêmement faible de la myéloculture chez l'immunocompétent (contribue au diagnostic dans 0 à 2 % des cas) [5,29].

TEP scanner

Le TEP scanner est une technique d'imagerie scintigraphique, couplée à la tomодensitométrie, où un traceur radioactif, le ^{18}F -fluorodesoxyglucose (^{18}FDG) est injecté

et va se distribuer aux cellules ayant une augmentation du métabolisme glucidique. Ainsi une hyperfixation sera constatée au niveau des lésions néoplasiques, inflammatoires, granulomateuses, infectieuses, en raison d'une forte activité glycolytique et donc d'une surexpression de différents transporteurs membranaires du glucose dans ces tissus [30]. Deux revues récentes ont recensé les études ayant étudié cette technique d'imagerie dans les FUO [5,31]. Hayakama et al. ont retenu cinq études ayant utilisé la TEP et sept la TEP couplée à la tomодensitométrie, parues entre 2000 et 2012 et ayant inclus respectivement 160 et 327 patients. La sensibilité et la spécificité de ces examens étaient de 84 et 76 % pour la TEP et de 89 et 71 % pour la TEP couplée à la tomодensitométrie [5]. Ces deux articles soulignent l'intérêt de cette technique, d'une part, car sa très bonne sensibilité, permet de guider d'autres investigations plus spécifiques (biopsies) [30,31] et, d'autre part, en raison d'une haute valeur prédictive négative. Il est ainsi licite en cas de TEP scanner négatif lorsque toute maladie inflammatoire multisystémique a été écartée d'interrompre les investigations pour s'en tenir à une simple surveillance [31]. Ainsi des auteurs tels que Bleeker-Rovers et al., dans une étude prospective multicentrique parue en 2007 positionnent le TEP scanner très tôt dans le bilan [32].

Fièvres récurrentes et maladies auto-inflammatoires

Définitions

Les fièvres récurrentes, intermittentes ou épisodiques ont été individualisées depuis les années 80/90 au sein des fièvres prolongées d'origine indéterminée. Ce sous-groupe correspond à des patients dont la fièvre répond aux critères de FPI mais dont les accès fébriles sont entrecoupés de phases asymptomatiques plus ou moins longues (48 heures pour De Kleinj, au moins deux semaines pour Knockaert) [33]. La fréquence de ces fièvres est difficile à préciser car peu de séries les prennent en compte, néanmoins, elle est non négligeable, allant de 18 à 42 % des cas selon les auteurs [33,34]. Par rapport aux « FUO classiques », on note dans ce sous-groupe que les patients sont significativement plus jeunes, que la durée des symptômes avant la prise en charge est plus longue. Les mêmes catégories diagnostiques que dans les FPI « classiques » vont être retrouvées (Tableau 2) [34–37]. Toutefois, contrairement aux fièvres « continues », les causes infectieuses, tumorales et inflammatoires non infectieuses sont plus rares, et les cas non résolus au contraire plus nombreux. Dans ce cadre, nous allons détailler plus précisément une nouvelle entité, les maladies auto-inflammatoires.

Maladies auto-inflammatoires, éléments de classification et de physiopathologie

Le terme de syndrome auto-inflammatoire a été proposé par M.F. McDermott et D.L. Kastner en 1999 pour désigner un groupe de maladies héréditaires caractérisées par des accès de fièvres récurrentes associées à des phénomènes inflammatoires notamment au niveau des séreuses

Tableau 2 Principales causes des fièvres intermittentes.

Infectieuses	Bactérienne : infection biliaire, prostatite, otite moyenne et mastoïdite, infection sur matériel étranger, abcès profond, ostéomyélite, thrombose septiques, endocardite, tuberculose, mélioïdose, yersiniose, maladie de Whipple, sodoku, borrélioses... Virale : certaines infections à herpes virus : EBV, HHV8 Parasitaire : toxoplasmose, paludisme, trypanosomiase	9–11,5 %
Néoplasiques	Hémopathies : lymphome non hodgkinien, maladie de Hodgkin, syndrome myélodysplasiques... Tumeurs solides : cancer colorectal, métastases...	5–15 %
Maladies inflammatoires non infectieuses	Maladie de Still de l'adulte Mastocytose, vascularites : maladie de Behçet, polychondrite atrophique Maladie de Crohn	9–11 %
Causes diverses	Fièvre médicamenteuse et fièvre professionnelle Pathomimie Maladie veineuse thromboembolique Syndrome auto-inflammatoire Maladie lymphoproliférative et histiocyttaire (Castellmann, Rosai-Dorfman...) Syndrome de Schnitzler Maladie de Gaucher, Fabry...	20–25 % (dont 2 à 12 % causée par la FMF)
Non retrouvées		45–52 %

et un syndrome inflammatoire biologique. Par opposition aux maladies auto-immunes, il n'y a pas d'auto-anticorps et de lymphocytes T spécifiques d'auto-antigènes [38–40]. Le rôle de l'IL-1 β cytokine majeure de l'inflammation et de l'immunité innée dans la physiopathologie de ces maladies a été démontré. Si les fièvres récurrentes héréditaires (FRH) constituent l'archétype des maladies auto-inflammatoires [41], le champ de ces maladies s'est élargi. Elles regroupent désormais des maladies de transmission mendélienne (FRH seules traitées dans cette dernière partie et d'autres pathologies telles que le syndrome de Blau, Majeed, PAPA...) ainsi que des maladies polyfactorielles (maladie de Crohn, goutte, maladie de Still...) [40]. Ces maladies sont liées à des désordres de l'immunité innée. Les FRH regroupent six maladies : fièvre méditerranéenne familiale (FMF), le syndrome *TNF receptor associated periodic syndrome* (TRAPS), anciennement dénommé fièvre hibernéenne familiale, le déficit partiel en mévalonate kinase (MKD), anciennement connu sous le nom de *Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome* (HIDS) et les cryopyrinopathies (urticaire familiale au froid [UFF]), syndrome de Muckle-Wells (MWS), syndrome *chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome* (CINCA), aussi appelé *neonatal onset multisystemic inflammatory disease* (NOMID).

Dans les cas des cryopyrinopathies, une mutation de la protéine NLRP3 aboutit à une activation pathologique de l'inflammasome (complexe protéique composé des protéines NLRP3, ASC et caspase 1) conduisant à une production dérégulée d'IL-1 β [40,41]. En ce qui concerne la FMF, bien que le gène *MEFV* responsable de la maladie ait été identifié en 1997 (218 mutations mises en évidence à ce jour) [42], le mécanisme par lequel la protéine pyrine/marénostriane une fois mutée entraîne les manifestations cliniques n'est pas encore exactement défini [43]. La pyrine aurait pour

rôle de limiter l'activation de *NLRP3* et de réguler négativement l'activité de la caspase 1. Aussi, une mutation de cette protéine entraînerait une sécrétion anormale d'IL-1 β [43]. Concernant le syndrome TRAPS, plus de 70 mutations du gène *TNFRSF1A* ont été mises en évidence. Les mécanismes par lesquels les différentes mutations entraînent ce syndrome ne sont pas encore bien appréhendés et semblent différer selon les mutations [44]. Plusieurs hypothèses sont évoquées par des études in vitro qui ont montré une altération de la voie de signalisation NF- κ B, du trafic intracellulaire du récepteur, une auto-activation du récepteur... [44]. Le MKD est lié à une mutation sur un gène codant pour une protéine intervenant dans la synthèse du cholestérol et des protéines isoprénylées, les mécanismes précis conduisant à ces manifestations ne sont pas encore compris mais il semblerait que ce soit le déficit des protéines isoprénylées qui entraînerait via un défaut géranyl-géranylation une production excessive d'IL-1 β [45].

Panorama des fièvres récurrentes héréditaires (FRH)

La présentation clinique, les gènes mutés, les traitements et le pronostic de ces différentes entités sont présentés dans le **Tableau 3** [39,43,44,46–50].

Une des caractéristiques de ces fièvres héréditaires est qu'elles peuvent se compliquer, dans un pourcentage variable de cas par une amylose secondaire AA dont l'issue est fatale dans les cinq à dix ans suivant le diagnostic d'amylose [40]. La prévalence de l'amylose n'est pas la même selon les différentes entités. Elle est plus prévalente en cas de FMF, en particulier en cas d'atteinte articulaire, d'homozygotie M694V, d'antécédent familial d'amylose et est plus atypique chez les patients porteurs d'un MKD

Tableau 3 Caractéristiques des fièvres récurrentes héréditaires.

	FMF	TRAPS	MKD	Cryopyrinopathies		
				UFF	MWS	CINCA/NOMID
Mode de transmission	Autosomique récessif	Autosomique dominant	Autosomique récessif	Autosomique dominant		
Gène	<i>MEFV</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>MVK</i>	<i>NLRP3 1</i>		
Chromosome	16p13	12p13	12q24	1q44		
Protéine	Marénostrine (ou pyrine)	Récepteur 1 du TNF (TNFR1)	Mévalonate kinase	Cryopyrine		
Prévalence	1/10 000	1/1,106 en Europe	Extrêmement rare (200 patients)	Extrêmement rare (300 patients)		
Répartition	Bassin méditerranéen (prévalence 1/200–1/1000)	Cosmopolite	Cosmopolite, prédominant en Europe du Nord	Cosmopolite, prédominant en Europe du Nord		
Âge de début des symptômes	< 20 ans	Variable (âge moyen : 3 ans, range : 2 semaines–50 ans)	Petite enfance	Enfance		
Périodicité des accès	Variable	Variable parfois continu	Toutes les 4/6 semaines	Variable (dépendant de l'environnement)	Quotidienne	Continu
Durée des accès	Heures à 3/4 j	1 à 3 semaines	4–6 j	< 24 h	Aggravation vespérale	Continu
Facteurs déclenchants des accès	Stress émotionnel, infection, menstruation	Stress émotionnel	Vaccination, infection, traumatisme	Froid (crise déclenchée quelques heures après exposition)	—	—
Atteinte cutanée	Pseudo-érysipèle 7–40 %	Rash migrateur Pseudo-érysipèle	Rash purpura	Rash urticaire	Urticaire	Urticaire
Atteinte musculo-quelettique	Mono ou oligoarthritis (50–75 %) parfois atteinte chronique érosive Myalgies	Myalgies Arthralgies, arthrite non érosive	Arthralgies, oligo ou polyarthrites non érosives Myalgie	Arthralgies Myalgies	Arthralgies et/ou arthrites	Arthralgies, Arthrites
Atteinte oculaire	—	Œdème periorbitaire Conjonctivite Uvéite	+	Conjonctivite	Conjonctivite	Conjonctivite Uvéite Cécité (atrophie optique)

FMF : fièvre méditerranéenne familiale ; TRAPS : le syndrome *TNF receptor associated periodic syndrome* ; MKD : déficit partiel en mévalonate kinase ; UFF : urticaire familiale au froid ; MWS : syndrome de Muckle-Wells.

[46,48,50]. Pour les MKD, une série rétrospective franco-belge ayant repris les données concernant 50 patients, il a été mis en évidence un nombre important d'infections sévères ou récurrentes (27% des patients). Il est à noter que trois patients présentaient une hypogammaglobulinémie et ce alors qu'ils ne recevaient pas d'immunosuppresseurs ou de corticoïdes [46].

Marqueurs biologiques

Marqueurs non spécifiques

Les anomalies retrouvées dans ces maladies sont, lors des accès aigus, une augmentation des marqueurs de l'inflammation : CRP, fibrinogène, VS, haptoglobine ainsi qu'une hypergammaglobulinémie polyclonale liée à la stimulation de la synthèse des gammaglobulines par les cytokines pro-inflammatoires. Il existe également des anomalies de la numération avec en particulier une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et en cas de syndrome inflammatoire plus prolongé : anémie, thrombocytose. Si ces anomalies se corrigent entre les accès, elles peuvent néanmoins persister à un taux inférieur [44].

Marqueurs plus spécifiques

Ces marqueurs sont comme suit :

- le sérum amyloïde A (SAA) est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation synthétisée et sécrétée par le foie après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α . Son extrémité N terminale peut se déposer sur différents organes sous forme de fibrilles amyloïdes conduisant au développement d'une amylose AA. Cette protéine n'est pas spécifique des maladies auto-inflammatoires mais elle est utilisée fréquemment dans le suivi de ces patients car elle constitue un paramètre utile à l'évaluation de l'activité clinique et de la réponse au traitement. Des concentrations élevées sont associées à un risque de dépôt amyloïde [44] ;
- la protéine S100A12 (ou calgranuline C) est une protéine sécrétée par les polynucléaires neutrophiles. Il a été démontré que les taux sériques de cette protéine sont extrêmement élevés en cas d'arthrite chronique juvénile et de FMF en poussée pouvant constituer un argument diagnostique pour ces maladies (un taux supérieur à 1400 ng/mL permet de distinguer une arthrite chronique juvénile d'une infection systémique avec une sensibilité de 66% et une spécificité de 94%) [51]. Par ailleurs, les taux de S100A12 sont corrélés à l'activité clinique de la maladie et à la réponse au traitement [44,52] ;
- récepteur soluble du TNF : celui-ci est abaissé (< 1 ng/mL) chez les patients atteints de TRAPS [44] ;
- Ig D sériques : dans les MKD, il peut exister une élévation des Ig D sériques. Mais ce marqueur peut, d'une part, faire défaut dans d'authentiques MKD et, d'autre part, être élevé dans d'autres maladies auto-inflammatoires (FMF, TRAPS) ainsi que dans des maladies néoplasiques et infectieuses. [53]. Une augmentation polyclonale des IgA est signalée chez 80% des patients suivis pour un MKD [47] ;
- dosages enzymatiques : en cas de MKD on observe une diminution de l'activité de la MKD et la présence d'acide mévalonique dans les urines au décours des accès [49] ;

- une fois le diagnostic évoqué devant l'existence de manifestations inflammatoires récurrentes chez un adulte jeune ayant d'autres membres de la famille présentant des signes semblables, la confirmation diagnostique de ces différentes entités requiert une analyse génétique [49]. L'identification de deux allèles parentaux mutés (homozygotie ou hétérozygotie composite) pour les maladies récessives (FMF, MKD) ou d'une mutation hétérozygote pour les maladies dominantes va permettre la confirmation du diagnostic. Toutefois, il convient de souligner que le diagnostic génétique ne permet pas de porter un diagnostic de certitude chez tous les patients (celui-ci n'est possible que chez 80% des patients atteints de FMF, 50 à 90% des patients atteints de cryopyrinopathies) car toutes les mutations ne sont pas encore identifiées à ce jour [52,54].

Conclusion

Bien qu'il n'existe pas à ce jour de marqueur biologique pathognomonique des différentes entités diagnostiques responsables des fièvres prolongées inexpliquées, il est acquis que des progrès notables ont été réalisés ces dernières décennies dans différents domaines de la biologie :

- marqueurs biochimiques : plus sensibles, plus spécifiques, à cinétique rapide (PCT) ;
- renouvellement d'intérêt pour de vieux marqueurs : éosinopénie ;
- développement des techniques de biologie moléculaire en microbiologie ;
- dans le domaine des maladies auto-inflammatoires, de nouvelles mutations génétiques continuent d'être identifiées. Celles-ci permettent de poser plus de diagnostics avec certitude et de bénéficier d'une meilleure compréhension de ces maladies. De nouveaux marqueurs de suivi de ces maladies (protéine S100A12) sont en cours d'évaluation.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
- [2] Mourad O, Palda V, Detsky AS. A comprehensive evidence-based approach to fever of unknown origin. *Arch Intern Med* 2003;163:545–51.
- [3] Petersdorf RG, Beeson PB. Fever of unexplained origin: report on 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 1961;40:1–30.
- [4] Madaule S, Delavigne K, Charlat I. Le paradoxe des fièvres prolongées inexpliquées. *Med Nucl Imag Fonct Metab* 2008;32:161–72.
- [5] Hayakawa K, Ramasamy B, Chandrasekar PH. Fever of unknown origin: an evidence-based review. *Am J Med Sci* 2012;344:307–16.

- [6] Zenone T. Fever of unknown origin in adults: evaluation of 144 cases in a non-university hospital. *Scand J Infect Dis* 2006;38:632–8.
- [7] Vidal E, Ly K, Fauchais AL, Monteil J. Fièvres prolongées d'origine inconnues. *Med Nucl Imag Fonct Metab* 2009;33:522–32.
- [8] Vanderschueren S, Knockaert DC, Adriaenssens T, Demey W, Dumez A, Blockmans D, et al. From prolonged febrile illness to fever of unknown origin, the challenge continues. *Arch Intern Med* 2003;163:1033–41.
- [9] Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805–12.
- [10] Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2004;39:206–17.
- [11] Limper M, de Kruif MD, Duits AJ, Brandjes DPM, van Gorp ECM. The diagnostic role of procalcitonin and other biomarkers in discriminating infectious from non-infectious fever. *J Infect* 2010;60:409–16.
- [12] Wolff M, Joly-Guillou ML. La procalcitonine (PCT): un outil diagnostique et de stratégie thérapeutique. *Rev Francoph Lab* 2011;434:1033–41.
- [13] Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin* 2006;22:503–19 [ix–x].
- [14] Irwin AD, Carrol EDL. Procalcitonin. *Arch Dis Child Educ Pract* 2011;96:228–33.
- [15] Semeraro M, Thomée C, Rolland E, Le Deley MC, Rossellini D, Troalen F, et al. A predictor of unfavourable outcome in neutropenic paediatric patients presenting with fever of unknown origin. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:284–90.
- [16] Wibrow BA, Ho KM, Flexman JP, Keil AD, Kohrs DL. Eosinopenia as a diagnostic marker of bloodstream infection in hospitalised paediatric and adult patients: a case-control study. *Anaesth Intensive Care* 2011;39:224–30.
- [17] Gil H, Magy N, Mauny F, Dupond JL. Value of eosinopenia in inflammatory disorders: an "old" marker revisited. *Rev Med Interne* 2003;24:431–5.
- [18] Cunha BA. Highly elevated serum ferritin levels as a diagnostic marker for Legionella pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008;46:1789–91.
- [19] Cunha BA. Fever of unknown origin (FUO): diagnostic importance of serum ferritin levels. *Scand J Infect Dis* 2007;39:651–2.
- [20] Cunha BA, Pherez FM, Katz DS. Fever of unknown origin (FUO) due to a solitary cavitary lung lesion: the deadly ferritin-laced doughnut. *Heart Lung J Crit Care* 2010;39:340–4.
- [21] Fautrel B. Adult-onset Still disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22:773–92.
- [22] Ben m'rad M, Leclerc-Mercier S, Blanche P, Franck N, Rozenberg F, Fulla Y, et al. Drug-induced hypersensitivity syndrome: clinical and biologic disease patterns in 24 patients. *Medicine (Baltimore)* 2009;88:131–40.
- [23] Larroche C. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: diagnosis and treatment. *Joint Bone Spine* 2012;79:356–61.
- [24] Fardet L, Coppo P, Kettaneh A, Dehoux M, Cabane J, Lambotte O. Low glycosylated ferritin, a good marker for the diagnosis of hemophagocytic syndrome. *Arthritis Rheum* 2008;58:1521–7.
- [25] Crook MA. Hyperferritinaemia; laboratory implications. *Ann Clin Biochem* 2012;49:211–3.
- [26] Garcia-Hejl C, Vest C, Garcia C, Renard C, Revenant M, Theffenne-Astier H, et al. Apport du laboratoire dans le diagnostic de la maladie de Still. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007;65:303–7.
- [27] Efsthathiou SP, Pefanis AV, Tsiakou AG, Skeva II, Tsioulos DI, Achimastos AD, et al. Fever of unknown origin: discrimination between infectious and non-infectious causes. *Eur J Intern Med* 2010;21:137–43.
- [28] Fournier PE, Thuny F, Richet H, Lepidi H, Casalta JP, Arzouni JP, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases. *Clin Infect Dis* 2010;51:131–40.
- [29] Hot A, Jaisson I, Girard C, French M, Durand DV, Rousset H, et al. Yield of bone marrow examination in diagnosing the source of fever of unknown origin. *Arch Intern Med* 2009;169:2018–23.
- [30] Bonardel G, Lecoules S, Mantzarides M, Carmoi T, Gontier E, Blade JS, et al. Positron emission tomography in internal medicine. *Presse Med* 2008;37:460–9 [1983].
- [31] Balink H, Verberne HJ, Bennink RJ, van Eck-Smit BLF. A rationale for the use of F18-FDG PET/CT in fever and inflammation of unknown origin. *Int J Mol Imaging* 2012;2012:165080.
- [32] Bleeker-Rovers CP, Vos FJ, Mudde AH, Dofferhoff ASM, de Geus-Oei LF, Rijnders AJ, et al. A prospective multi-centre study of the value of FDG-PET as part of a structured diagnostic protocol in patients with fever of unknown origin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:694–703.
- [33] Vidal E. Fièvres récurrentes non génétiques. *Rev Med Interne* 2006;27:S261–3.
- [34] Knockaert DC. Recurrent fevers of unknown origin. *Infect Dis Clin North Am* 2007;21:1189–211 [xi].
- [35] Le Moing V, Leport C. Intermittent fever of infectious origin. *Rev Prat* 2002;52:139–44.
- [36] Cador-Rousseau B, Cazalets-Lacoste C, Grosbois B. Intermittent fever of neoplastic origin. *Rev Prat* 2002;52:145–8.
- [37] Hachulla E. Symptomatic intermittent fever of inflammatory diseases. *Rev Prat* 2002;52:160–6.
- [38] Doria A, Dayer JM, Punzi L. Autoinflammatory diseases: how to put the fire inside the body out? *Autoimmun Rev* 2012;12:1–4.
- [39] Doria A, Zen M, Bettio S, Gatto M, Bassi N, Nalotto L, et al. Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmun Rev* 2012;12:22–30.
- [40] Jéru I, Amselem S. Inflammasome and interleukin 1. *Rev Med Interne* 2011;32:218–24.
- [41] Pétrilli V, Martinon F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine* 2007;74:571–6.
- [42] Soriano A, Manna R. Familial Mediterranean fever: new phenotypes. *Autoimmun Rev* 2012;12:31–7.
- [43] Savic S, Dickie LJ, Wittmann M, McDermott MF. Autoinflammatory syndromes and cellular responses to stress: pathophysiology, diagnosis and new treatment perspectives. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2012;26:505–33.
- [44] Cantarini L, Lucherini OM, Muscari I, Frediani B, Galeazzi M, Brizi MG, et al. Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): state of the art and future perspectives. *Autoimmun Rev* 2012;12:38–43.
- [45] Stoffels M, Simon A. Hyper-IgD syndrome or mevalonate kinase deficiency. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:419–23.
- [46] Bader-Meunier B, Florkin B, Sibilia J, Acquaviva C, Hachulla E, Grateau G, et al. Mevalonate kinase deficiency: a survey of 50 patients. *Pediatrics* 2011;128:e152–9.
- [47] Lachmann HJ. Clinical immunology review series: an approach to the patient with a periodic fever syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011;165:301–9.
- [48] Obici L, Merlini G. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmun Rev* 2012;12:14–7.
- [49] Grateau G, Duruöz MT. Autoinflammatory conditions: when to suspect? How to treat? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010;24:401–11.

- [50] Stankovic K, Grateau G. Auto-inflammatory syndromes: diagnosis and treatment. *Joint Bone Spine* 2007;74:544–50.
- [51] Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, et al. S100A12 is a novel molecular marker differentiating systemic-onset juvenile idiopathic arthritis from other causes of fever of unknown origin. *Arthritis Rheum* 2008;58:3924–31.
- [52] Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J, Foell D. Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2010;69:677–82.
- [53] Ammouri W, Cuisset L, Rouaghe S, Rolland MO, Delpech M, Grateau G, et al. Diagnostic value of serum immunoglobulinaemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatol (Oxford)* 2007;46:1597–600.
- [54] Touitou I. New genetic interpretation of old diseases. *Autoimmun Rev* 2012;12:5–9.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



STRATÉGIES D'EXPLORATION FONCTIONNELLE ET DE SUIVI THÉRAPEUTIQUE

Activité adénosine désaminase pleurale : un outil de choix pour le diagnostic des pleurésies tuberculeuses dans les pays à haute prévalence



Pleural adenosine deaminase activity and tuberculous pleural effusion: A useful diagnostic tool in high prevalence countries

H. Delacour^{a,*}, C. Ficko^b, A. Bousquet^a, S. Bugier^a,
É. Fontan^a, F. Ceppa^a

^a Hôpital d'instruction des armées Bégin, fédération de biologie clinique, 69, avenue de Paris, 94163 Saint-Mandé cedex, France

^b Service des maladies infectieuses et tropicales, hôpital d'instruction des armées Bégin, 69, avenue de Paris, 94163 Saint-Mandé cedex, France

Reçu le 30 juillet 2013 ; accepté le 13 septembre 2013

MOTS CLÉS

Adénosine
désaminase ;
Pleurésie
tuberculeuse

KEYWORDS

Adenosine
deaminase;
Tuberculous pleurisy

Résumé Dans les zones de haute prévalence tuberculeuse, les pleurésies tuberculeuses constituent la première étiologie des pleurésies séro-fibrineuses. De nombreux biomarqueurs, dont la détermination de l'activité adénosine désaminase pleurale, ont été proposés pour aider au diagnostic de cette entité clinique et palier les limites des outils diagnostics classiques (examen direct, culture...). Bien que de nombreuses études aient démontré l'intérêt de la détermination de l'activité adénosine désaminase pleurale, ce marqueur reste assez méconnu. L'objectif de cet article est de rappeler son intérêt en axant notre propos sur les pays à forte prévalence tuberculeuse.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Summary Tuberculous pleurisy (TP) is one of the most common aetiologies of lymphocytic predominant pleural effusion in tuberculous endemic areas. Its definitive diagnosis depends on isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in the pleural effusion or pleural tissue, but mycobacterial culture requires weeks to obtain the results and exhibits poor performances. Also various biomarkers, including pleural adenosine deaminase activity (ADA), have been proposed to assist the diagnosis of TP. Many studies have investigated the usefulness of this biomarker for the early diagnosis of TP. Measurement of ADA in pleural effusion is thus likely to be a useful diagnosis tool for TP.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hervé.delacour@santarm.fr (H. Delacour).

Introduction

Les pleurésies constituent, après la tuberculose pulmonaire, l'une des manifestations les plus fréquentes de la tuberculose. On estime que près de 5 % des patients souffrant d'une tuberculose présenteront un épanchement pleural au cours de leur maladie. Dans les zones à forte prévalence, les pleurésies tuberculeuses constituent la première étiologie des pleurésies séro-fibrineuses [1]. Dans ces zones, le diagnostic des pleurésies tuberculeuses est le plus souvent présomptif et aboutit à l'instauration d'un traitement antituberculeux probabiliste [2]. Cette démarche repose essentiellement sur des arguments épidémiologiques, anamnestiques et cliniques du fait de l'accessibilité réduite aux outils diagnostiques, ces derniers présentant par ailleurs des performances diagnostiques assez faibles. Depuis plus d'une trentaine d'années, l'intérêt de la détermination de l'activité adénosine pleurale (ADA) dans le diagnostic des pleurésies tuberculeuses mais aussi dans d'autres manifestations tuberculeuses extrapulmonaires (méningites, péricardites, péritonites) a été souligné par de nombreuses études [3]. Différentes conférences de consensus mentionnent ce test, sans recommander toutefois son utilisation en routine dans le diagnostic des pleurésies tuberculeuses [4–6]. Ce test restant assez méconnu, l'objectif de cet article est de rappeler son intérêt dans le diagnostic des pleurésies tuberculeuses en axant notre propos sur les pays à forte prévalence tuberculeuse.

Adénosine désaminase : rappels physiologiques et méthodologiques

L'adénosine désaminase (adénosine aminohydrolase, EC 3.5.4.4) est une enzyme clé du métabolisme des purines. Sa fonction principale est de réguler la concentration intracellulaire en adénosine et désoxyadénosine en catalysant leur désamination respective en inosine et désoxyinosine qui est nécessaire à l'activation et à la prolifération lymphocytaire et monocytaire, celles-ci étant inhibées par des concentrations trop élevées en adénosine. Le déficit génétique en adénosine désaminase (OMIM 120700) est ainsi responsable d'une immunodéficience combinée sévère liée à un hypofonctionnement des lymphocytes B et T [7].

L'activité ADA résulte de l'action de deux isoenzymes : l'ADA-1 et l'ADA-2. L'ADA-1 est exprimée dans toutes les cellules de l'organisme, avec une activité plus élevée dans les lymphocytes et les monocytes. L'ADA-2 n'est exprimée que dans les cellules de la lignée monocytaire. Ces deux isoenzymes se différencient par des caractéristiques biochimiques (pH_i, constante de Michaelis-Menten, affinité relative à différents substrats et inhibiteurs) mises à profit pour les différencier.

Différentes méthodes de détermination de l'activité ADA sont décrites dans la littérature [8–10]. La méthode historique de Giusti [8] reste la plus utilisée, ce qui permet une certaine uniformité des résultats au niveau international et leur comparaison. Cette technique manuelle, simple et peu coûteuse permet la détermination de l'activité ADA totale (ADA-1+ADA-2). Une de ses variantes permet une détermination de l'activité ADA-2 après ajout d'un inhibiteur spécifique de l'ADA-1, l'EHNA

(erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine) [11]. Récemment, des techniques automatisées sont apparues sur le marché. Adaptables sur différents systèmes, mais beaucoup plus coûteuses, elles possèdent des performances analytiques supérieures à celle de la méthode historique de Giusti (en termes de répétabilité, reproductibilité, temps analytique) [12]. Cependant, l'hétérogénéité des résultats obtenus avec ces techniques rend impossible une comparaison inter-laboratoire des résultats [13].

Les prélèvements biologiques pour détermination de l'activité ADA doivent être recueillis sur tube sec et conservés à +4 °C si l'analyse est effectuée dans les 15 jours ou à –20 °C pour des délais supérieurs. Une conservation à température ambiante est à éviter, une décroissance de l'activité ADA étant observée au cours du temps. Différentes solutions de conservation ont été proposées pour permettre une conservation prolongée des échantillons à température ambiante [14, 15]. Toutefois, dans notre expérience, elles se révèlent inefficaces à des températures ambiantes élevées (> 37 °C), situation fréquemment observée dans les pays à forte prévalence de tuberculose [16].

Variations de l'activité ADA pleurale au cours des pleurésies tuberculeuses

Les premières études sur les variations de l'activité ADA pleurale au cours des pleurésies tuberculeuses datent de la fin des années 1970. Elles ont mis en évidence une élévation de l'activité ADA pleurale, due principalement à une augmentation de l'activité ADA-2. L'activité en ADA pleurale ne paraît pas être en relation avec le nombre absolu de lymphocytes mais plutôt avec leur niveau de stimulation [17].

Suite à ces premières observations, de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer l'intérêt diagnostique de la détermination de l'activité ADA pleurale dans la pleurésie tuberculeuse. Leurs résultats ont fait l'objet ces dernières années de plusieurs méta-analyses [18–20]. Ces différentes études concluent à l'intérêt de ce paramètre dans le diagnostic précoce des pleurésies tuberculeuses. Selon Liang et al. [20], pour une valeur seuil de 40 U/L, seuil le plus communément retenu avec la méthode de Giusti, la sensibilité et la spécificité de ce test sont d'environ 90 % et les rapports de vraisemblance positif (L) et négatif (λ) respectivement de 9,0 et de 0,1. Ainsi, dans les zones de forte prévalence, la valeur prédictive positive de ce test atteint plus de 95 % et la valeur prédictive négative plus de 65 % [20]. Le statut VIH des patients ne modifie pas ces performances diagnostiques, la sensibilité de ce test restant très élevée même chez des patients présentant des taux très bas en lymphocytes CD₄⁺ [21]. Ces performances sont à rapprocher de celles des autres tests biologiques mis en œuvre dans le cadre du diagnostic des pleurésies tuberculeuses (Tableau 1).

Les « faux-négatifs » étant rares, devant un résultat négatif chez un patient présentant une forte suspicion clinique de pleurésie tuberculeuse, une répétition de la détermination de l'activité ADA pleurale sur un second prélèvement effectué à quelques jours de distance est recommandée [23].

Les « faux-positifs » sont principalement observés au cours des empyèmes. Ces entités cliniques sont cependant

Tableau 1 Performances diagnostiques de différents tests biologiques dans le diagnostic de la pleurésie tuberculeuse [22].

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Délai d'obtention du résultat	Coût
<i>Examen direct du liquide pleural (coloration de Zhiel-Nielsen)</i>	~ 5	~ 95	< 1 journée	+
<i>Culture du liquide pleural^a</i>				
Sur milieu de Lowenstein-Jensen	12–43	~ 95	3–5 semaines	++
En milieu liquide (type BACTEC ou BBL MGIT)	24–75	~ 95	3–5 semaines	++
<i>Techniques d'amplification génique</i>	62–77	91–97	< 1 journée	+++

^a La sensibilité de la culture du liquide pleural est accrue chez les sujets séropositifs.

aisément distinguables des pleurésies tuberculeuses tant sur le plan clinique que biologique. Beaucoup plus rarement, une élévation de l'activité ADA pleurale peut être observée dans des pleurésies lymphocytaires non tuberculeuses telles que les pleurésies cancéreuses (en particulier au cours des lymphomes), les pleurésies au cours des infections à *Brucella* spp. ou à *Coxiella burnetii* ou les pleurésies au cours des maladies de système (pleurésie rhumatoïde ou pleurésie lupique). Le contexte clinique et les examens complémentaires (scanner thoracique, bilan auto-immun), s'ils sont accessibles, permettent dans la grande majorité de cas d'effectuer le diagnostic différentiel. De plus, l'élévation de l'activité ADA pleurale au cours des pleurésies tuberculeuses reste généralement modérée. Des activités très élevées (> 250 U/L) sont principalement observées au cours des empyèmes et des pleurésies cancéreuses [22,24].

L'intérêt de la détermination des activités pleurales des différentes isoformes de l'ADA a fait l'objet de quelques travaux [25–27]. Ceux-ci ont conclu à des performances diagnostiques supérieures ou égales à celles de l'activité ADA pleurale totale. Ces résultats, obtenus sur un nombre

limité de patients, doivent cependant être confirmés par des études à plus large échelle.

Activité ADA pleurale et scores diagnostiques

Plusieurs scores diagnostiques intégrant l'activité ADA pleurale sont proposés dans la littérature. Plus ou moins faciles d'utilisation, ils associent données démographiques (âge du patient), biologiques (ADA pleurale, LDH pleurales, protides pleuraux...) et cliniques (température, durée des symptômes).

Le score proposé par Porcel et Vives en 2003 repose sur une combinaison de 4 paramètres (âge du patient, température, ADA et hématies pleurales) pondérés par un coefficient allant de 1 à 5 (Tableau 2). De mise en œuvre facile, il est associé à de très bonnes performances diagnostiques (Se : 0,95, Sp : 0,94, L : 15,8, λ : 0,05). Il est intéressant de souligner qu'une activité ADA pleurale supérieure à 40 U/L permet à elle seule de poser le diagnostic de pleurésie tuberculeuse avec ce score [28].

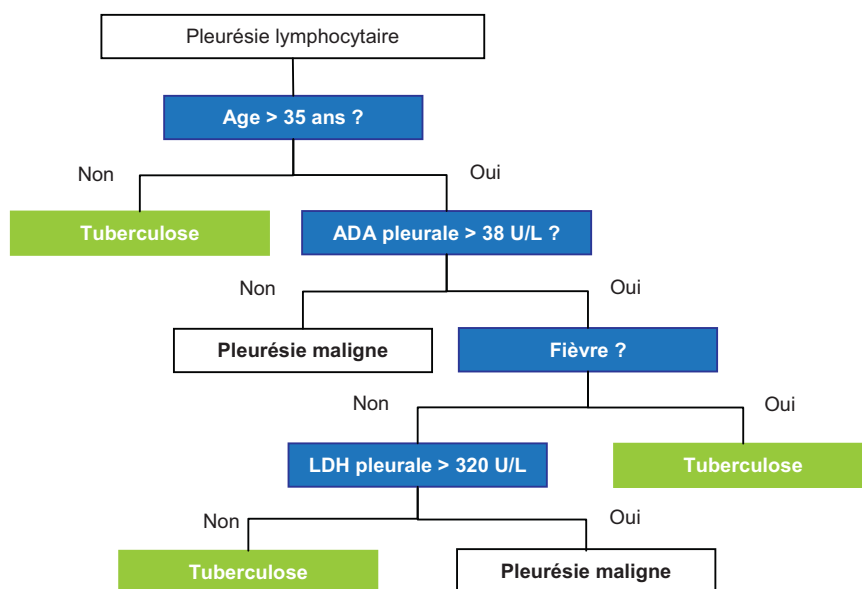


Figure 1 Arbre décisionnel pour le diagnostic différentiel des pleurésies tuberculeuses et cancéreuses. Adapté de [29].

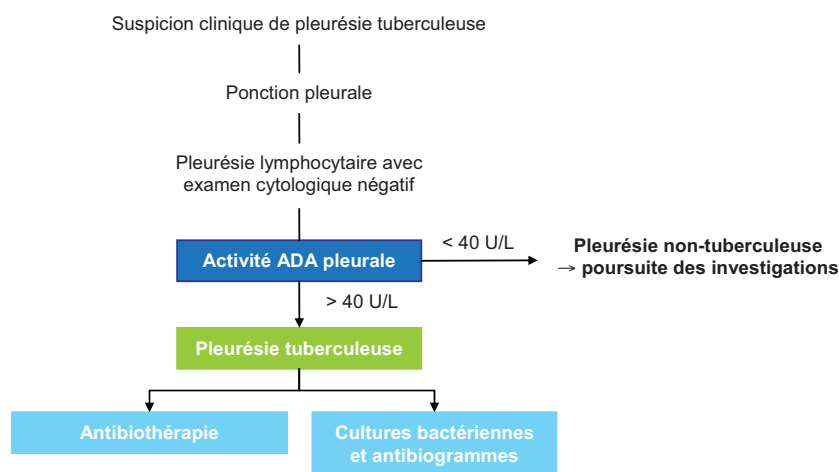


Figure 2 Place de la détermination de l'activité adénosine désaminase pleurale dans le diagnostic des pleurésies tuberculeuses dans les pays à haute incidence tuberculeuse.

Adapté de [22].

Plus récemment, le même auteur a proposé un arbre décisionnel combinant 4 paramètres (âge du patient, température, ADA et LDH pleurales) (Fig. 1). Ayant fait l'objet d'une validation sur une cohorte de patients indépendante, cette démarche diagnostique présente des performances diagnostiques légèrement inférieures au premier score pour exclure le diagnostic de pleurésie tuberculeuse (Se: 0,85, Sp: 0,97, L: 28,3, λ : 0,15) [29].

Intégration de la détermination de l'activité ADA pleurale dans la démarche diagnostique d'une pleurésie supposée tuberculeuse

Dans les pays à forte prévalence tuberculeuse, face à une pleurésie lymphocytaire, la détermination de l'activité ADA pleurale peut constituer un test de première intention pour exclure ou retenir le diagnostic de pleurésie tuberculeuse. Un résultat positif ($|ADA| > 40$ U/L, méthode Giusti) permet de poser le diagnostic de pleurésie tuberculeuse du fait de son excellente valeur prédictive positive (VPP > 95 %). À l'inverse, un résultat négatif doit entraîner une poursuite de l'investigation étiologique selon les conditions décrites précédemment. La détermination de l'activité ADA pleurale permettrait de limiter ainsi le nombre de traitement antituberculeux probabiliste. Par ailleurs, elle permettrait

de restreindre aux seuls patients positifs les investigations bactériologiques complémentaires (cultures bactériennes et antibiogrammes), diminuant ainsi les ressources nécessaires (Fig. 2).

Conclusions

La détermination de l'activité adénosine désaminase pleurale constitue un outil intéressant et peu onéreux pour le diagnostic des pleurésies tuberculeuses. Ce paramètre possède des performances diagnostiques supérieures à celles des autres tests biologiques classiquement utilisés pour le diagnostic des pleurésies tuberculeuses. Sa mise en œuvre permet de conforter l'hypothèse diagnostique en cas de positivité ($ADA > 40$ U/L, technique Giusti) et d'instaurer un traitement antituberculeux. Tout résultat positif doit être suivi dans la mesure du possible par la réalisation de cultures bactériennes afin de pouvoir étudier par la suite la sensibilité de la souche tuberculeuse aux antibiotiques.

Déclaration d'intérêts

Hervé Delacour est membre du comité de rédaction de la revue *Immunoanalyse et biologie* spécialisée. Les autres auteurs (F. Cécile, B. Aurore, B. Sarah, F. Éléonore, C. Franck) déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Valdés L, Alvarez D, Valle JM, Pose A, San José E. The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest* 1996;109:158–62.
- [2] Sané M, Ba-Fall K, Lefebvre N, MOUNGUENGUI D, Camara P, Niang A, et al. Le traitement antituberculeux présomptif est-il licite dans la pleurésie lymphocytaire exsudative inexpliquée au Sénégal? *Rev Pneumol Clin* 2007;63:247–50.

Tableau 2 Système de score pour le diagnostic des pleurésies tuberculeuses [28].

Paramètres	Coefficient de pondération
Activité adénosine pleurale (ADA) > 40 U/L (technique Giusti)	5
Âge < 35 ans	2
Température > 37,8 °C	2
Hématies pleurales < 5,10 ⁹ /mm ³	1
Pleurésie tuberculeuse si score ≥ 5 (Se: 0,95, Sp: 0,94, L: 15,8, λ : 0,05).	

- [3] El Jahiri Y, Chellak S, Garcia C, Ceppa F, Burnat P. L'intérêt du dosage de l'adénosine désaminase dans les liquides biologiques au cours d'une tuberculose. *Ann Biol Clin* 2006;64:117–24.
- [4] ATS. Diagnostic standards and classifications of TB. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376–95.
- [5] Hooper C, Lee YC, Maskell N, BTS Pleural Guideline Group. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society Pleural Disease Guideline 2010. *Thorax* 2010;65(Suppl. 2):ii4–17.
- [6] Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Prévention et prise en charge de la tuberculose en France — Synthèse et recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (2002–2003). *Rev Mal Respir* 2003;20:51–106.
- [7] Conway EJ, Cooke R. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochem J* 1939;33:479–92.
- [8] Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: New York, Academic Press; 1974. p. 303–7.
- [9] Oosthuizen HM, Ungerer JP, Bissbort SH. Kinetic determination of serum adenosine deaminase. *Clin Chem* 1993;39:2182–5.
- [10] Villena V, Navarro-Gonzalez JA, Garcia-Benayas C, Manzanos JA, Echave J, Lopez-Encuentra A, et al. Rapid automated determination of adenosine deaminase and lysozyme for differentiating tuberculous and nontuberculous pleural effusions. *Clin Chem* 1996;42:218–21.
- [11] Andreasyan NA, Hairapetyan HL, Sargisova YG, Mardanyan SS. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. *FEBS Lett* 2005;579:643–7.
- [12] Delacour H, Sauvanet C, Ceppa F, Burnat P. Analytical performances of the Diazyme ADA assay on the Cobas® 6000 system. *Clin Biochem* 2010;43:1468–71.
- [13] Delacour H, Cuvelier I, Hermet C, Sanmartin N, Larréché S, Ceppa F. Impact des techniques sur la détermination de l'activité adénosine désaminase pleurale. *Immunol Biol Spe* 2012;27:276–8.
- [14] Miller KD, Barnette R, Light RW. Stability of adenosine deaminase during transportation. *Chest* 2004;126:1933–7.
- [15] Antonangelo L, Vargas FS, Almeida LP, Acencio MM, Gomes FD, Sales RK, et al. Influence of storage time and temperature on pleural fluid adenosine deaminase determination. *Respirology* 2006;11:488–92.
- [16] Delacour H, Lyatmi M, Ceppa F, Burnat P. Activité adénosine désaminase dans le liquide pleural : recommandations pour une conservation optimale des échantillons. *Immunol Biol Spe* 2011;26:158–60.
- [17] Piras MA, Gakis C, Budroni M, Andreoni G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J* 1978;2:1751–2.
- [18] Greco S, Girardi E, Masciangelo R, Capocchetta GB, Saltini C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7:777–86.
- [19] Morisson P, Neves DD. Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. *J Bras Pneumol* 2008;34:217–24.
- [20] Liang QL, Shi HZ, Wang K, Qin SM, Qin XJ. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med* 2008;102:744–54.
- [21] Baba K, Hoosen AA, Langeland N, Dyrhol-Riise AM. Adenosine deaminase activity is a sensitive marker for the diagnosis of tuberculous pleuritis in patients with very low CD4 counts. *PLoS ONE* 2008;3:e2788.
- [22] Porcel JM. Tuberculous pleural effusion. *Lung* 2009;187:263–70.
- [23] Orriols R, Coloma R, Ferrer J, Vidal R, Morell F. Adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Chest* 1994;106:1633–4.
- [24] Porcel JM, Esquerda A, Bielsa S. Diagnostic performance of adenosine deaminase activity in pleural fluid: a single-center experience with over 2100 consecutive patients. *Eur J Intern Med* 2010;21:419–23.
- [25] Pérez-Rodríguez E, Jiménez Castro D. The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6:259–66.
- [26] Zemlin AE, Burgess LJ, Carstens ME. The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:214–20.
- [27] Keng LT, Shu CC, Chen JY, Liang SK, Lin CK, Chang LY, et al. Evaluating pleural ADA, ADA2, IFN- γ and IGRA for diagnosing tuberculous pleurisy. *J Infect* 2013;67:294–302.
- [28] Porcel JM, Vives M. Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med Sci Monit* 2003;9:CR175–80.
- [29] Porcel JM, Alemán C, Bielsa S, Sarrajo J, Fernández de Sevilla T, Esquerda A. A decision tree for differentiating tuberculous from malignant pleural effusions. *Respir Med* 2008;102:1159–64.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

La leucémie à plasmocytes : à propos d'un cas



Plasma cell leukemia: A case report

W. Moatemri^a, A. Bouatay^a, Y. Ben Youssef^b, M. Zaier^b,
N. Braham Jmili^{a,*}, M. Kortas^a

^a Laboratoire d'hématologie, CHU Farhat-Hached, 4000 Sousse, Tunisie

^b Service d'hématologie clinique, CHU Farhat-Hached, Sousse, Tunisie

Reçu le 30 mai 2013 ; accepté le 23 juillet 2013

KEYWORDS

Plasma cell leukemia;
Multiple myeloma;
Plasmacytoma;
Myelogram;
Prognosis

MOTS CLÉS

Leucémie à
plasmocytes ;
Myélome multiple ;
Plasmocytome ;
Myélogramme ;
Pronostic

Summary Plasma cell leukemia is a rare lymphoproliferative disorder characterized by malignant proliferation of plasma cells in bone marrow and peripheral blood. It is primitive (in 60% of cases) or secondary complicating of multiple myeloma. In this context, we report a case diagnosed in Farhat-Hached Hospital in Sousse (Tunisia) of multiple myeloma transformed into plasma cell leukemia with an extra-osseous location. Leukemic transformation of multiple myeloma is rare and should be sought since it changes the prognosis of the disease. On the occasion of this observation, we emphasize the importance of careful cytological smear of blood for patients with multiple myeloma during the monitoring of chemotherapy.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Résumé La leucémie à plasmocytes est un désordre lymphoprolifératif rare caractérisé par la prolifération maligne de plasmocytes dans la moelle osseuse et le sang périphérique. Elle peut être primitive (dans 60% des cas) ou secondaire compliquant un myélome multiple connu. Dans ce contexte, nous rapportons une observation diagnostiquée à l'hôpital Farhat-Hached de Sousse (Tunisie) de myélome multiple transformé en leucémie à plasmocytes avec une localisation extra-osseuse. La transformation leucémique d'un myélome multiple est rare et mérite d'être recherchée étant donné qu'elle change le pronostic de la maladie. À l'occasion de cette observation, nous insistons sur l'importance de l'examen cytologique minutieux du frottis de sang pour les patients atteints de myélome multiple lors du suivi sous chimiothérapie.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : jmlinejia@yahoo.fr (N. Braham Jmili).

Introduction

La leucémie à plasmocytes (LP) est une prolifération maligne des cellules plasmocytaires définie par la présence de plus de 20 % de plasmocytes dans la formule sanguine et un nombre absolu supérieur à $2 \times 10^9/L$ dans le sang circulant [1,2]. On distingue deux formes : la forme primitive (60 % des cas) survenant de novo chez des patients sans myélome multiple (MM) préexistant et diagnostiquée d'emblée par une phase leucémique révélant un myélome jusque-là méconnu et la forme secondaire (40 % des cas) consiste en la transformation leucémique d'un MM déjà connu [2–4]. L'intérêt du travail est de montrer l'importance de l'examen cytologique du sang dans la surveillance et le suivi d'un MM en vue de diagnostiquer le plus précocement possible une évolution vers une LP.

Observation

Un homme de 53 ans consulte en rhumatologie pour l'exploration de lombosciatique gauche associée à des lésions ostéolytiques. À la radiologie, de multiples lésions à l'emporte-pièce ont été observées. La biopsie des lésions dorsales a montré une infiltration plasmocytaire à expression monoclonale Kappa confirmée par un myélogramme infiltré de 30 % de plasmocytes avec des signes de dystrophie. L'électrophorèse des protéines (EPP) sanguines et l'immunofixation ont permis de conclure à un myélome à chaîne légère Kappa (1,55 g/L) et une hypogammaglobulinémie (Fig. 1). Les résultats biochimiques n'ont objectivé aucune atteinte hépatique ni rénale mais une LDH à 323 UI/L. Le caryotype a montré plusieurs anomalies cytogénétiques : 46, XY, del(1)(q21), add(8)p(23), add(14)(q32) et add(21)(p11). Le diagnostic de MM type III A à chaîne légère

Electrophorèse Capillaire des protéines sériques

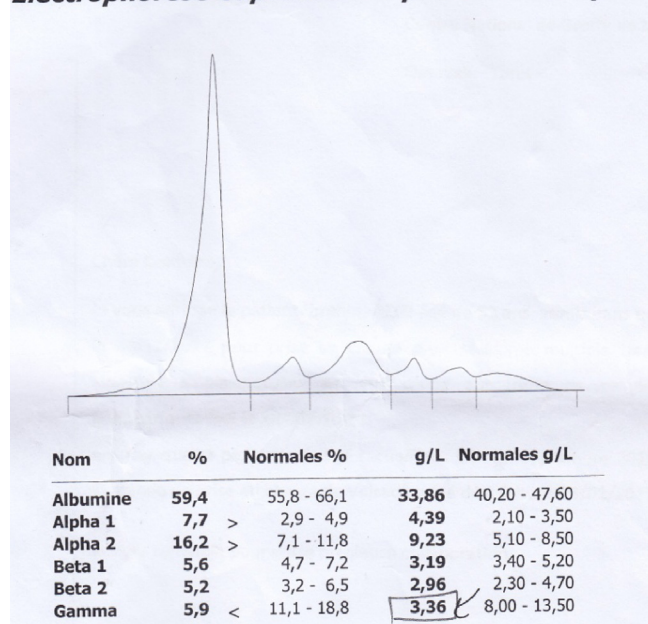


Figure 1 Profil électrophorétique (électrophorèse capillaire des protéines sérique).

Kappa a été retenu. Un traitement par l'association thalidomide et dexaméthasone a été débuté. Le patient consulte après quelques mois pour gingivorragies et des douleurs osseuses. Une numération formule sanguine (NFS) a été faite et a permis de poser le diagnostic de LP : une plasmocytose supérieure à 20 % (GB : 6400 dont 8 % plasmocytes et 26 % de plasmoblastes (Fig. 2) associée à une anémie normochrome normocytaire (Hémoglobine à 8,5 g/dL) et une thrombopénie à 20 000/mm³. Le myélogramme, fait le jour même, a montré une infiltration plasmocytaire : 72 % de plasmocytes et plasmoblastes. Le caryotype a montré la présence d'un clone pathologique avec des anomalies de structure des chromosomes : 1, 5, 8, 14, 15 et 21. Le MM a évolué en LP au bout de 6 mois de traitement par la dexaméthasone et thalidomide. L'association VAD et thalidomide a été débutée en vue d'une autogreffe de cellules souches périphériques. Le suivi régulier de la formule sanguine et le myélogramme a montré une diminution significative de la plasmocytose et une normalisation de l'anémie et la thrombopénie. Après trois mois de la nouvelle association, alors que la LP est en rémission complète, la découverte d'une tuméfaction cervicale a objectivé un plasmocytome extra-osseux (30 % de cellules blastiques). L'apparition d'un plasmocytome a nécessité la poursuite du traitement. Le patient est décédé avant son transfert pour la greffe de moelle.

Discussion

La LP est une forme rare et gravissime du MM. Elle résulte d'une prolifération monoclonale de cellules plasmocytaires sécrétantes [1,2]. Notre patient fait partie des malades atteints de MM ayant développé une LP. En effet, la LP est considérée comme étant une forme atypique et agressive du MM. Elle se distingue du MM par ses particularités cliniques et biologiques, son évolution très rapide et son mauvais pronostic. L'incidence de la LP est de 2,6–4 % pour les patients atteints de MM et 12 % pour ceux atteints de MM avec forte masse tumorale [3,4]. Sur le plan physiopathologique, il a été démontré que de nombreuses mutations sur les gènes codant pour les molécules d'adhésion (CD56, N-CAM, I-CAM, LFA...) entraînent une perte de l'affinité des plasmocytes de

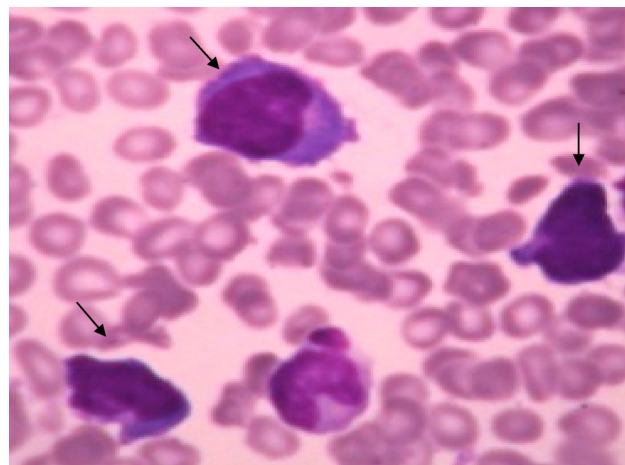


Figure 2 Présence de plasmoblastes et de plasmocytes (sang, objectif 100-MGG).

la LP pour le stroma médullaire qui seraient à l'origine de leur passage extramédullaire [5,6].

La LP comporte une présentation clinique classique associant asthénie, douleurs osseuses, syndrome anémique et hémorragique. Cependant, le tableau est plus agressif que celui du MM avec une plus grande fréquence des atteintes extramédullaires, essentiellement les atteintes hépatiques et spléniques, respectivement dans 52 et 40 % des cas de LP primitive et dans moins de 20 % des cas de LP secondaire. Des atteintes ganglionnaires, pleuro-pulmonaires, digestives et des muscles squelettiques, des testicules et de la peau sont également rapportées [1,4,7]. La fréquence des lésions osseuses lytiques est plus faible (40–60 %) que dans le MM [8]. Les anomalies biologiques les plus fréquentes sont l'anémie et la thrombopénie. L'anémie est habituellement sévère ($Hb < 8,5 \text{ g/dL}$) et le plus souvent de type normocytaire normochrome. Elle est retrouvée dans 50 % des cas [8]. La thrombopénie (nombre de plaquettes inférieur à 100 G/L), rare dans le MM au diagnostic, est présente chez plus que la moitié des patients atteints de LP [1]. Ces cytopénies sanguines sont secondaires à l'effet suppresseur de cytokines, libérés par les cellules NK, sur les précurseurs myéloïdes. Le nombre de plasmocytes sanguins dépasse $2 \times 10^9/\text{L}$ par définition, avec des valeurs allant jusqu'à $100 \times 10^9/\text{L}$. Le myélogramme est nettement infiltré (valeurs moyennes de 76 à 83 %) par des plasmocytes. Les plasmocytes sont classiquement bien différenciés avec un noyau excentré, un cytoplasme fortement basophile et une zone claire paranucléaire. Des plasmocytes dystrophiques sont également souvent présents (cytoplasme flammé, vacuoles, inclusions cytoplasmiques, multinucléarité, contours irréguliers, bourgeonnements, noyau peu excentré, chromatine, présence de nucléoles). L'hypercalcémie et l'insuffisance rénale sont plus fréquentes dans la LP que dans le MM avec des fréquences de 40 à 50 % selon les séries publiées. Un taux sérique élevé de la b2-microglobuline, reflet de la masse tumorale, est retrouvé dans 65 % des cas de LP. Le LDH sérique, facteur de pronostic péjoratif, est augmenté dans 48 % des cas de LP. Un pic monoclonal sérique ou urinaire est souvent détecté chez les patients atteints de LP mais des cas de LP non sécrétantes ont été rapportés dans la littérature [1,4].

Les plasmocytes de la LP présentent un immunophénotype proche de celui du MM avec une hyperexpression des antigènes de surface CD38 et CD138. L'absence d'expression du CD56 sur les plasmocytes tumoraux a été considérée comme la signature d'une LP. Le profil des plasmocytes de la LP est donc CD38+, CD56±, CD19–. L'expression de Fas/Apo1 est décrite dans toutes les leucémies à plasmocytes, en particulier ceux qui sont associés à une atteinte extramédullaire. Le CD28, marqueur de l'évolution tumorale du MM, est détecté dans 92 % des cas de LP secondaire et dans seulement 33 % des LP primitives [5,9,10].

L'étude cytogénétique montre qu'il existe des points communs mais aussi des différences entre le MM et le LP. Le caryotype est presque toujours complexe, avec nombreux gains et pertes de chromosomes et diverses translocations (translocation 14q32) [5,11,12].

La prise en charge thérapeutique des LP reste pour l'heure très peu satisfaisante. La LP est habituellement de très mauvais pronostic avec des médianes de

survie de l'ordre de 12 à 14 mois pour les LP primaires et de deux à trois mois pour les LP secondaires. Selon les quelques séries étudiées, le traitement par chimiothérapie de type melphalan–prednisone semble peu efficace (taux de réponse de 20 à 30 %) que les traitements par polychimiothérapie (VAD) (taux de réponse de 40 à 60 %). Des traitements de consolidation par autogreffe, allogreffe classique ou, plus récemment, par allogreffes à conditionnement atténué, sont proposés dans la littérature aux patients répondeurs [5,13].

Conclusion

La LP est une complication de mauvais pronostic surtout si le MM est à chaîne légère et si la masse tumorale est faite essentiellement de plasmoblastes et de plasmocytes dystrophiques. Les anomalies biologiques et cytogénétiques impliquent une résistance aux traitements et un envahissement sanguin et extra-osseux de la plasmocytose conférant à cette forme un sombre pronostic et une médiane de survie de 28 mois. Par conséquent, l'intérêt de l'examen cytologique du frottis sanguin et des cytoponctions ganglionnaires est primordial dans le suivi du MM. Il permet de diagnostiquer le plus précocement possible une infiltration sanguine, ainsi que l'évolution vers un plasmocytome.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Guïze R, Moreau S, Dupire S, Coiteux V, Facon T, Leleu X. La leucémie à plasmocytes. *Hematologie* 2005;11(3):217–25.
- [2] Manier S, Leleu X. Myélome multiple: diagnostic clinique et perspective de traitement. *Recommandations de l'International Myeloma Working Group (IMWG)*. *Immunanalyse et biologie spécialisée* 2011;26:125–36.
- [3] Jurczyszyn A, Zawirska D, Skotnicki AB. Plasma cell leukemia: a highly aggressive monoclonal gammopathy with a very poor prognosis. *Przegl Lek* 2011;68:320–5.
- [4] Messaoudia N, Chakoura M, El Ktaibib A, Tagjdida R, Belmekkia A, Mbarek N. Leucémie à plasmocytes primitive: une forme rare de leucémie et de prolifération plasmocytaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 2009;416:7–10.
- [5] Rodriguez C, Pont JC, Gouin-Thibault I, Andrieu AG, Molina T, Le Tourneau A, et al. La leucémie à plasmocytes. *Ann Biol Clin* 2005;63(5):535–9.
- [6] Costello R, Chaïbi P, Rousselot P. La leucémie à plasmocytes, une forme particulière du myélome multiple. *Hematologie* 1996;2:296–300.
- [7] Costello R, Sainty D, Bouabdallah R, Fermand JP, Delmer A, Divine M. Primary plasma cell leukaemia: a report of 18 cases. *Leuk Res* 2001;25:103–7.
- [8] Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M, Tabernero MD, Blade J, Moro MJ. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999;93:1032–7.
- [9] Alonso ML, Rubiol E, Mateu R, Estivill C, Bellido M, Balmana J. cCD79a expression in a case of plasma cell leukemia. *Leuk Res* 1998;22:649–53.

- [10] Hata H, Matsuzaki H, Takeya M, Yoshida M, Sonoki T, Nagasaki A, et al. Expression of Fas/Apo-1 (CD95) and apoptosis in tumor cells from patients with plasma cell disorders. *Blood* 1995;86:1939–45.
- [11] Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, Callet-Bauchu E, Terre C, Lafage-Pochitaloff M, et al. Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the intergroupe francophone du myélome and the groupe français de cytogénétique hématologique. *Blood* 2001;97:822–5.
- [12] Chombart B, Gagneux Lemoussu L, Eschard JP, Ackah Miezian S, Novella JL, Brochot P, et al. Facteurs pronostiques du myélome utilisables en pratique courante: suivi sur dix ans de 148 malades âgés de plus de 55 ans. *Rev Rhum* 2005;72:1299–305.
- [13] Azais I, Brault R, Debais F. Nouvelles thérapies du myélome. *Rev Rhum* 2010;77:21–7.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

La carence maternelle en vitamine B12 : quelles conséquences pour le nouveau-né ? À propos d'un cas marocain



Maternal vitamin B12 deficiency: What consequences for the newborn? About Moroccan case

S. Elmachrani Idrissi^a, N. El Omri^{b,*}, R. El Jaoudi^c, F. Chibani^a,
A. Biazé^a, A. Dami^a, S. Bouhsain^a, Z. Ouzzif^a, L. Chabraoui^d

^a Service de biochimie, hôpital militaire Mohammed V, Rabat, Maroc

^b Service de médecine interne B, hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc

^c Service de pharmacologie et toxicologie, faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, Rabat, Maroc

^d Laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, Rabat, Maroc

Reçu le 1^{er} juin 2013 ; accepté le 24 juin 2013

KEYWORDS

Vitamin B12
deficiency;
Pernicious anemia;
Cobalamin;
Hemolysis;
Breastfeeding;
Thrombotic
microangiopathy

Summary The stock of newborn vitamin B12 (VitB12) comes exclusively from placental transfer. After dietary diversification, the VitB12 is provided by foods of animal origin. The aim of this observation is to point out the serious consequences of maternal VitB12 deficiency for infants exclusively breastfed and the importance of early diagnosis of this pathology. This observation is a concrete feature of daily collaboration between clinician and biologist, which is an essential point of the ISO standard EN 15189 concerning laboratories accreditation.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : elmactaniidrissi@yahoo.fr (S. Elmachrani Idrissi), elomri-nawal@yahoo.fr (N. El Omri), eljaoudi-rachid@yahoo.fr (R. El Jaoudi), chibani28@yahoo.fr (F. Chibani), biaze@yahoo.fr (A. Biazé), abdami@yahoo.fr (A. Dami), bouhsain1@yahoo.fr (S. Bouhsain), ouzzifadil@yahoo.fr (Z. Ouzzif), l.chabraoui@yahoo.fr (L. Chabraoui).

MOTS CLÉS

Déficit en vitamine B12 ;
Anémie de Biermer ;
Cobalamine ;
Hémolyse ;
Allaitement maternel ;
Microangiopathie

Résumé Le stock en vitamine B12 (VitB12) du nouveau-né provient exclusivement du transfert placentaire. Après la diversification alimentaire, la VitB12 est apportée par les aliments d'origine animale. L'objectif de notre observation est de faire le point sur les conséquences gravissimes de la carence maternelle en VitB12 pour le nourrisson nourri exclusivement au sein ainsi que l'importance du diagnostic précoce de cette pathologie. Cette observation est un exemple concret de collaboration clinicien-biologiste, permettant le respect de la norme ISO EN 15189 sur l'accréditation des laboratoires.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Observation

Il s'agissait d'un nourrisson de sept mois, fils unique, admis pour exploration d'un ictère, il était issu d'une grossesse bien suivie menée à terme avec accouchement médicalisé, bien vacciné selon le programme national d'immunisation et nourri exclusivement au sein. Le début de la symptomatologie remontait à l'âge de deux mois par l'apparition de vomissements intermittents sans diarrhée, quatre mois plus tard il présentait un ictère isolé évoluant dans un contexte d'apyrexie et de conservation de l'état général. L'examen clinique trouvait un nourrisson en bon état général pesant 7,5 kg, apyrétique, pâle, présentant un ictère cutanéomuqueux, il n'y avait pas de splénomégalie ni d'hépatomégalie et la coloration des urines et des selles était normale. L'évolution était marquée par l'aggravation de son état au cours de l'hospitalisation, avec apparition de troubles neurologiques à type de trémulations, d'absences puis de crises convulsives à répétition avec à l'examen une hypotonie et une régression psychomotrice ce qui avait nécessité son transfert en réanimation.

Au plan biologique, notre patient avait une anémie à 6,9 g/dL normochrome (CCMH : 33 %) normocytaire (VGM : 94 fl) et arégénérative (réticulocytes : 17 900/mm³), associée à une thrombopénie à 82 000/mm³ sans anomalies de la lignée blanche. L'étude du frottis sanguin révélait une anisopoikylocytose avec de nombreux schizocytes et l'étude de la moelle par aspiration au niveau du tibia n'était pas concluante.

La bilirubinémie était à 50 mg/L faite essentiellement de bilirubine libre (41 mg/L), l'haptoglobine était effondrée inférieure à 0,2 g/L et les LDH très augmentées à 3200 UI/L ce qui confirme le caractère hémolytique de l'anémie. Le bilan étiologique de l'hémolyse était négatif (électrophorèse de l'hémoglobine, test de Coombs, résistance globulaire et dosages d'enzymes érythrocytaires à savoir la glucose 6 phosphate déshydrogénase et la pyruvate kinase).

Devant l'association de l'hémolyse à la thrombopénie une microangiopathie thrombotique (MAT) était évoquée malgré une fonction rénale conservée (urée : 0,18 g/L ; créatinine : 3 mg/L). La mesure de l'activité de la protéase du facteur Willebrand (ADAMTS13) était à 91 % avec un intervalle de référence (IR) de 50–150 % et la fraction C3 du complément était normale.

Le reste du bilan biologique était sans anomalies (glycémie : 1,01 g/L ; ferritinémie : 79 ng/mL ; bilan d'hémostase et sérologies virales HVB, HVC, VIH).

L'échographie abdominale était normale, l'échographie transfontanellaire montrait un aspect d'hygroma sous-dural frontal minime sans anomalies associées et la radiographie des deux avants bras et des poignets de face montrait une minéralisation normale de la trame osseuse avec un âge osseux estimé à un an selon l'Atlas de Greulich et Pyle. La fibroscopie gastrique objectivait une pangastrite congestive.

Devant l'apparition des signes neurologiques, une IRM cérébrale était réalisée montrant une atrophie cortico-souscorticale diffuse avec des anomalies de signal des noyaux caudés s'étendant vers les noyaux lenticulaires et en para-ventriculaires plaçant en faveur d'une anomalie métabolique ou congénitale. Les investigations ont été orientées vers le métabolisme de la vitamine B12 (VitB12) révélant un taux effondré de VitB12 à 64 pmol/L (IR : 141 à 489 pmol/L) et de méthionine à 5 µmol/L (IR : 19 à 31 µmol/L) avec une augmentation de l'homocystéine sérique à 3 µmol/L (IR < 2 µmol/L) et de l'acide méthylmalonique (AMM) urinaire à 485,25 µmol/mmol de créatinine (IR < 2 µmol/mmol).

Le bilan biologique de la maman n'avait pas montré d'anémie (Hb : 12,5 g/dL) ni de macrocytose (VGM : 83 fl) mais la VitB12 était effondrée avec présence d'anticorps anti-cellules pariétales en faveur d'une maladie de Biermer d'autant plus que la fibroscopie digestive avait montré une gastrite atrophique.

Le diagnostic retenu était celui d'une anémie par carence en VitB12 due à un allaitement exclusif au sein chez une maman ayant une anémie de Biermer méconnue. Le traitement faisait appel au début à la transfusion de culots globulaires vue la profondeur de l'anémie puis à la plasmathérapie en pensant à une MAT. Après redressement du diagnostic, une vitaminothérapie à base d'hydroxocobalamine était instaurée à la dose de 1 mg/jour jusqu'à la survenue d'une crise réticulocytaire (signe d'efficacité du traitement) puis 1 mg/semaine jusqu'à correction de l'hémogramme ensuite une injection tous les 15 jours et enfin une injection par mois qu'on a arrêté après une bonne diversification alimentaire à base de soupes enrichies en protéines animales en particulier le foie de bœuf. Le traitement associait également de l'acide folique

à raison de 5 mg/j, de la carnitine à 500 mg/j et du citrate de la bétaine à 325 mg/j. L'évolution était favorable et sans séquelles neurologiques avec un recul de sept mois.

Discussion

La carence en VitB12 est souvent fruste ou dissociée responsable de tableaux extrêmement polymorphes et de gravité variable. La VitB12 ou cobalamine provient uniquement d'aliments d'origine animale. Les besoins journaliers sont estimés entre 1 et 2 pg chez l'enfant [1]. Dans l'intestin, elle se lie au facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Dans l'entérocyte, la vitamine est absorbée et ensuite libérée vers la circulation portale puis vers les tissus grâce à un deuxième transporteur, la transcobalamine II. La VitB12, sous sa forme réduite (cobalt mono- ou divalent) est un coenzyme indispensable dans deux réactions biochimiques (Fig. 1), la première est la transformation de l'homocystéine en méthionine par méthylation dans le cytoplasme, la deuxième transforme le méthylmalonyl CoA en succinyl coenzyme A dans la mitochondrie [2]. Ces deux réactions dépendantes de la cobalamine permettent de réduire les quantités de ces deux substances potentiellement toxiques : l'homocystéine responsable de lésions endothéliales vasculaires et le méthylmalonate responsable entre autre d'acidose métabolique. Ce mécanisme d'action des cobalamines explique chez notre patient qui présente un déficit en VitB12, la diminution de la méthionine et l'augmentation de l'homocystéine et de l'AMM.

La carence en VitB12 via l'altération de la synthèse de l'ADN, affecte principalement les tissus à renouvellement rapide. Au niveau médullaire, elle est responsable d'une mort cellulaire prématurée particulièrement des précurseurs érythroïdes et donc d'une érythropoïèse inefficace par « avortement intra médullaire », se traduisant sur

l'hémogramme par une anémie macrocytaire franche (VGM supérieur à 110 fl), normochrome et arégénérative avec mégalo blastose médullaire donnant un aspect de « moelle bleue ». Ces deux éléments indispensables au diagnostic n'ont pas été retrouvés chez notre patient ce qui a engendré un retard diagnostique. En effet, l'importance du nombre de schizocytes, débris d'hématies de faible volume, explique la discrétion de la macrocytose à 94 fl jugée par le VGM. Les anomalies du frottis sanguin sont caractéristiques : hématies de grande taille, anisocytose, corps de Jolly, déformation globulaires, avec ovalocytes, les granulocytes sont de grande taille avec des noyaux hypersegmentés. L'hémolyse intramédullaire se traduit biologiquement par une élévation du taux des LDH et de la bilirubine libre et une diminution du taux d'haptoglobine, tableau biologique retrouvé chez notre patient. La confusion diagnostique était extrême dans l'observation rapportée, en effet, l'association d'une thrombopénie et d'une anémie avec signes d'hémolyse et présence de schizocytes évoquait en premier lieu une MAT. En raison du caractère périphérique de l'hémolyse, la réticulocytose devrait être élevée, mais elle était basse chez notre patient. Dans la littérature, il est décrit que dans les carences vitaminiques, il peut exister des signes biologiques d'hémolyse avec une réticulocytose basse associés à des schizocytes [3].

Le syndrome clinique correspondant à un déficit en VitB12 chez le nourrisson a été bien individualisé depuis la publication de Jadhav et al. en 1962, rapportant six cas d'enfants Indiens [4]. Une centaine de cas de nourrissons carencés en VitB12 a été décrite dans la littérature dont 64 % de mères végétariennes allaitantes, 24 % de mères avec maladie de Biermer, les autres étaient liés à des pathologies digestives ou des carences générales [5].

L'apport des cobalamines au fœtus se fait par voie transplacentaire et permet habituellement la constitution des réserves hépatiques néonatales pour six à huit mois.

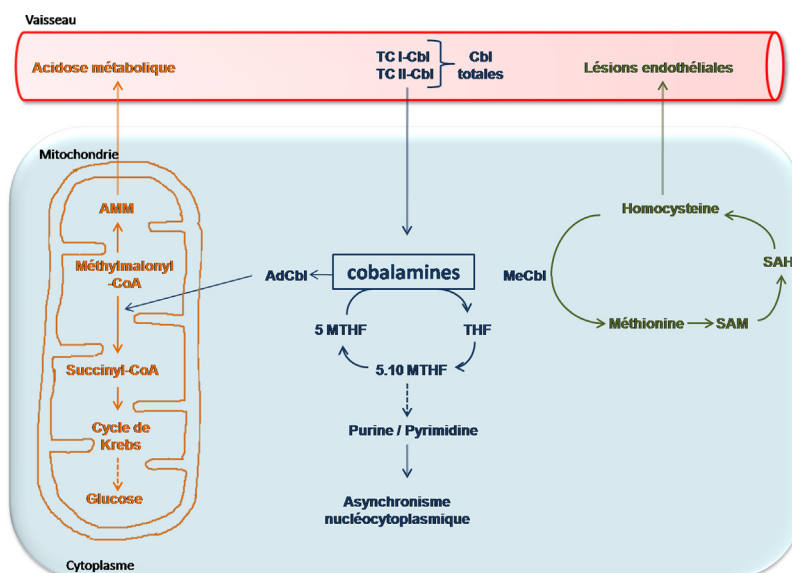


Figure 1 Réactions métaboliques impliquant les cobalamines. SAM : S adénosylméthionine ; SAH : S adénosylhomocystéine ; THF : tétrahydrofolate ; 5 MTHF : 5 méthyltétrahydrofolate ; 5.10 MTHF : 5.10 méthylène tétrahydrofolate ; AMM : acide méthylmalonique ; Cbl : cobalamine ; AdCbl : adénosyl cobalamine ; MeCbl : méthylcobalamine ; TCI-Cbl : transcobalamine I ; TCII-Cbl : transcobalamine II ; MAT : microangiopathie thrombotique ; VitB12 : vitamine B 12.

Les carences maternelles entraînent une diminution des réserves néonatales puis une décroissance progressive des taux dans les mois qui suivent s'il n'y a pas d'autres apports que le lait maternel. Ces situations décrites initialement chez des enfants allaités par des mères malnutries dans les pays en voie de développement comme l'Inde peuvent survenir également chez des mères allaitant de façon exclusive lorsqu'elles sont végétariennes strictes ou atteintes de maladie de Biermer, c'est le cas de notre patient.

Dans la littérature, des cas de MAT ont été décrits. Andrès et al. [1] ont rapporté six patients présentant cette pathologie, avec pour tous une anémie hémolytique, un VGM élevé, une thrombopénie et un nombre élevé de schizocytes. Le diagnostic d'anémie de Biermer avait été retenu chez quatre d'entre eux et les deux autres avaient un syndrome de malabsorption. Récemment, il a été décrit un cas analogue de MAT liée à un déficit en VitB12 chez un enfant de 13 ans suivant un régime végétalien non avoué par les parents.

Le déficit en VitB12 est une cause rare et traitable de régression psychomotrice. Chez l'adulte, l'atteinte la mieux connue du système nerveux en cas de déficit en VitB12 est une démyélinisation des cordons postérieurs et latéraux de la moelle ou sclérose combinée de moelle épinière, connue aussi sous le nom de « neuro-Biermer ». Toutefois, l'atteinte nerveuse périphérique n'est pas rare et s'associe souvent à l'atteinte centrale. Les atteintes neurologiques paraissent plus sévères chez le nourrisson que chez l'adulte avec une expression plus cérébrale que médullaire. En effet, les données de l'imagerie retrouvent chez l'adulte des lésions de dégénérescence subaiguë combinée de la moelle alors que l'atrophie cérébrale prédomine chez l'enfant comme en témoigne notre observation. Cependant, le pronostic à long terme reste incertain avec plusieurs cas de retard psychomoteur séquellaire décrits malgré la normalisation radiologique [5]. Chez notre patient l'évolution était favorable avec disparition des signes cliniques et correction des paramètres biologiques. La survenue de mouvements anormaux à l'instauration du traitement a été souvent décrite et n'existe pas pour notre patient. Le mécanisme est mal connu et l'hypothèse de l'hyperglycémie a été discutée et réfutée. L'arrêt de croissance pondérale puis staturale survenant après l'épuisement des stocks de VitB12 est multifactorielle : l'anorexie, les vomissements et l'atrophie villositaire partielle ainsi que les troubles neuropsychiatriques y participant [5]. Certains auteurs ont insisté sur le risque de séquelles neurologiques qui serait d'autant plus fréquent que le retard diagnostique est long. C'est dire la nécessité de prévenir la carence en VitB12 chez la femme enceinte et les mères allaitantes ayant un régime inhabituel.

Le dépistage des femmes enceintes et/ou des nouveau-nés est largement discuté, argumenté par l'existence

d'un traitement simple et efficace permettant d'éviter les séquelles neurologiques. Cependant, la numération sanguine peut être normale chez la maman présentant une maladie de Biermer comme chez notre patiente, il est donc important de préciser à l'interrogatoire le mode d'alimentation maternelle, les antécédents familiaux et personnels à la recherche de contexte dysimmunitaire et éventuellement compléter l'exploration par les dosages de la VitB12, homocystéine, AMM, ainsi que la recherche d'anticorps anti-facteur intrinsèque.

Conclusion

Chez le nourrisson, en particulier celui nourri exclusivement au sein, la survenue d'une anémie hémolytique arégénérative même en l'absence de macrocytose doit inclure de façon précoce une recherche de carence en VitB12 chez celui-ci et chez la maman. Le retard diagnostique peut avoir des conséquences neurologiques irréversibles voir même létales.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Au Dr Arnaud Garnier, néphrologie – médecine interne – hypertension pédiatrique, hôpital des enfants, Toulouse, pour son aide à l'orientation du diagnostic.

Références

- [1] Abourazzak S, Chaouki S, Idrissi M, Atmani S, Hida M. Pseudo-microangiopathie thrombotique liée à un déficit en vitamine B12. *Arch Pediatr* 2012;19:616–9.
- [2] Rasmussen SA, Fernhoff PM, Scanlon KS. Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 2001;138:10–7.
- [3] Blanc J, Legrand L, Marc I. Faux Moskowitz, vrai Biermer. *Rev Med Interne* 1999;20:1046–7.
- [4] Sabouraud P, Bednarek N, Billette de Villemeur T, Hallalel F, Elqomry M, Trentesaux AS, et al. Une cause rare de régression psychomotrice du nourrisson : deux cas de carence en vitamine B12. *Arch Pediatr* 1998;5:1179.
- [5] Mathey C, Di Marcoa JN, Poujola A, Cournellea MA, Brevautb V, Liveta MO, et al. Stagnation pondérale et régression psychomotrice révélant une carence en vitamine B12 chez 3 nourrissons. *Arch Pediatr* 2007;14:467–71.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Leucémie aiguë néonatale révélée par Blueberry Muffin syndrome (à propos d'un cas)

Neonatal acute leukemia revealed by Blueberry Muffin syndrome (a case report)

I. Tlamçani*, S. Benjelloun, G. Yahyaoui, N. Benseddik, M.H. Amrani

Laboratoire d'hématologie, laboratoire central d'analyses médicales, CHU Hassan II, BP 30000, Fès, Maroc

Reçu le 9 avril 2013 ; accepté le 24 avril 2013

KEYWORDS

Acute leukemia;
Myeloblastic;
Neonatal period;
Skin lesion;
Blueberry Muffin
syndrome

MOTS CLÉS

Leucémie aiguë ;
Myéloblastique ;
Période néonatale ;
Lésion cutanée ;
Blueberry Muffin
syndrome

Summary Acute leukemia is uncommon in neonates and has a much poorer prognosis than in older children. We report a case of acute myeloblastic leukemia observed in a neonate who had skin lesions (Blueberry Muffin syndrome), bleeding and hepatosplenomegaly at birth, which justified intensive care since the first postnatal week. The patient died 13 days after. We present here physical and laboratory findings, which indicate a grim prognosis. These criteria should be considered carefully in order to ensure realistic information for the parents and appropriate decision.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé La leucémie aiguë est une maladie exceptionnelle en période néonatale et son pronostic est sévère, bien moins bon que chez les enfants plus âgés. Le Blueberry Muffin syndrome se manifeste par des lésions cutanées sous forme de papulonodules violacées disséminées sur tout le corps, présent dès la naissance et doit faire rechercher la présence d'éventuelles infections congénitales, d'incompatibilités fœto-maternelles ou de pathologies tumorales. Nous rapportons un cas de leucémie aiguë myéloblastique néonatale qui s'est manifestée par un Blueberry Muffin syndrome ainsi qu'un syndrome hémorragique et tumoral présents dès la naissance ce qui a justifié une prise en charge en réanimation dès la première semaine de vie. L'évolution a été fatale après 13 jours de vie.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : tlemcanimane@hotmail.com (I. Tlamçani), salmabenj@hotmail.com (S. Benjelloun), ghitayahyaoui2007@gmail.com (G. Yahyaoui), b-najoua@hotmail.com (N. Benseddik), moncef34@hotmail.com (M.H. Amrani).

Introduction

La leucémie aiguë néonatale est une affection exceptionnelle (moins de 1 % de toutes les leucémies de l'enfant) et de mauvais pronostic, puisqu'elle constitue la première cause de mortalité par tumeur maligne en période néonatale. Il s'agit le plus souvent d'une forme myéloblastique (LAM) [1]. Le Blueberry Muffin syndrome correspond à des papulonodules disséminés, présents dès la naissance et caractérisé par des éléments allant du rouge vif au bleu gris. Plusieurs causes peuvent être responsables de ce syndrome, notamment :

- les infections congénitales ;
- les maladies hémolytiques du nouveau-né ;
- les pathologies tumorales [2].

Nous rapportons un cas de leucémie aiguë néonatale de type myéloblastique (LAM) qui s'est manifesté par des lésions cutanées, un syndrome hémorragique, et une hépato-splénomégalie à la naissance.

Observation

Il s'agit d'un nouveau-né de sexe masculin admis à J1 de vie au service de réanimation néonatale, issu d'une grossesse menée à terme. Il n'y a pas de notion de consanguinité. Il est hospitalisé pour prise en charge de sa détresse respiratoire associée à une éruption cutanée généralisée. L'examen général retrouve un nouveau-né à terme sans signes de dysmorphie, hypotonique et peu réactif qui présente une détresse respiratoire. L'examen cutanéomuqueux retrouve des lésions papulonodulaires violacées sur tout le corps prédominant au visage et au cuir chevelu. L'examen de la cavité buccale objective des gingivorragies. Le score de Silverman est à 5/10 sans râles à l'auscultation pulmonaire. L'examen abdominal retrouve une hépatomégalie de 6 cm, et une splénomégalie à deux travers de doigts du rebord costal. Devant ce tableau, une série d'examen complémentaires a été réalisée et a montré une hyperleucocytose à 88 000 éléments/mm³, une thrombopénie à 66 000 éléments/mm³ et une anémie à 10 g/dL. Le frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) montre la présence de 33 % de blastes circulants. Les LDH sont à 4840 UI/L et l'acide urique à 93 mg/L. Le bilan infectieux a montré une CRP à 125 mg/L avec hémoculture positive à *Enterococcus faecalis*. Les groupes sanguins du bébé et de la mère sont A rhésus positif et O rhésus positif, respectivement. Le bilan d'hémolyse est normal. Les sérologies virales (VIH, HVB et HVC) et TORSCH (toxoplasmose, rubéole, syphilis, cytomégalovirus et herpès) du nouveau-né et de la mère sont négatives. Le myélogramme montre une moelle de richesse moyenne à pauvre ; le décompte des blastes est estimé à 38 %, faits de myéloblastes de grande taille, à noyau irrégulier, à chromatine relativement déliée et nucléolée, et à cytoplasme basophile et étendu (Fig. 1). La coloration cytochimique à la myéloperoxydase est discrètement positive (Fig. 2). L'immunophénotypage a retrouvé des blastes exprimant les marqueurs myéloïdes : leucocytes humains antigènes (HLA-DR), CD13, CD14, CD33 et CD64 en faveur d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM) de

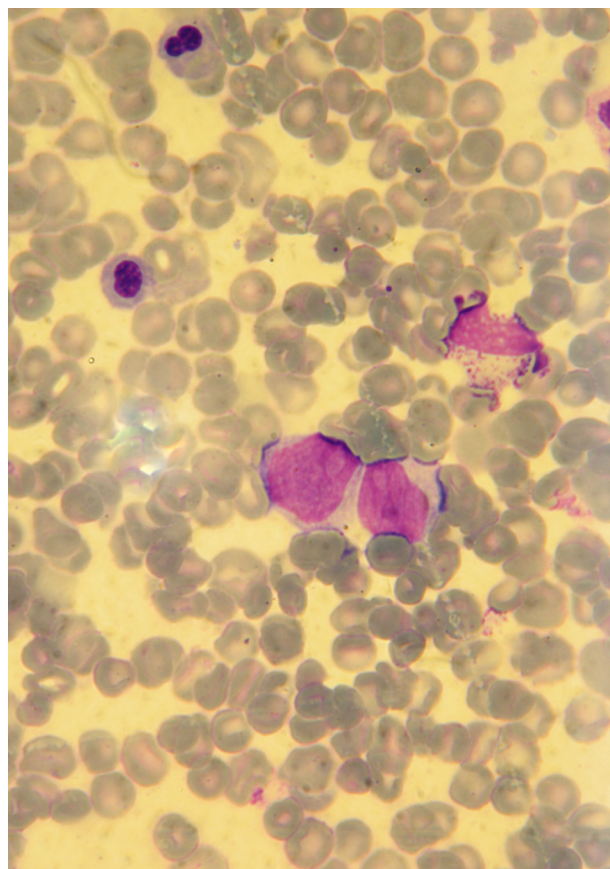


Figure 1 Frottis médullaire coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) montrant l'infiltration de la moelle osseuse par de nombreux blastes de taille moyenne à grande, à noyau arrondi et nucléolé, à chromatine déliée et cytoplasme basophile et réduit (grossissement $\times 100$).

type monoblastique. L'étude cytogénétique n'a pas été réalisée. La radiographie thoracique ne montre pas la présence de leucostase. L'échographie abdominale a montré une hépato-splénomégalie homogène. Compte tenu des données de la clinique, de l'hémogramme, du myélogramme et de l'immunophénotypage, le diagnostic est celui de leucémie aiguë myéloblastique type LAM5 selon le FAB (classification Franco-Américano-Britannique). Le nouveau-né a été mis sous oxygénothérapie (3 L/min), une hyperhydratation alcaline, une antibiothérapie et l'allopurinol. L'évolution a été marquée par l'aggravation de l'hyperleucocytose qui a atteint 200 000 éléments/mm³ avec 85 % de blastes circulants et l'augmentation de la CRP. Le patient est décédé au treizième jour de vie dans un tableau de septicémie.

Discussion

Les leucémies aiguës (LA) du nouveau-né sont des maladies très rares qui se distinguent des LA de l'enfant par leur présentation clinique (hépato-splénomégalie, atteinte méningée et atteinte cutanée plus fréquentes), leur présentation biologique (formes hyperleucocytaires), leur association à des réarrangements du gène *mixed lineage leukemia* (MLL) dans 68 % des cas et la fréquence d'anomalies cytogénétiques associées (jusqu'à 93 % dans certaines

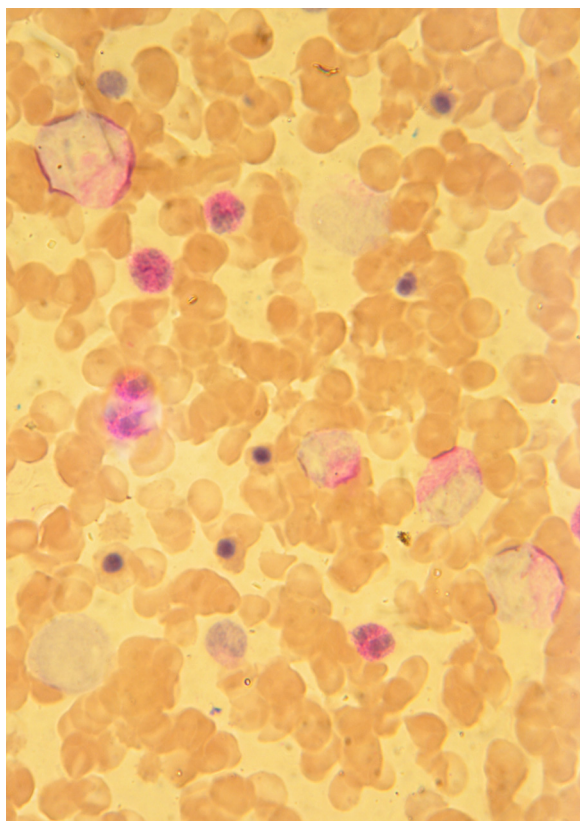


Figure 2 Présence de blastes discrètement positifs à la coloration cytochimique à la myéloperoxydase (grossissement $\times 100$).

séries) [1]. Elles constituent la deuxième cause de cancer après le neuroblastome chez l'enfant de moins de 1 an, et la première cause de décès par tumeur maligne en période néonatale. À cette période de la vie, les LAM sont les plus fréquentes (56 %) avec une prépondérance des leucémies monoblastiques de type M5 (41,6 %) selon la classification FAB [2].

Quatre critères sont nécessaires pour la définition d'une leucémie aiguë néonatale, qu'ils soient présents dès la naissance ou qu'ils apparaissent dès les quatre premières semaines de vie :

- la présence de leucocytes immatures dans le sang ou la moelle osseuse ;
- l'infiltration des tissus extra-hématopoïétiques ;
- l'absence d'affection responsable de réactions leucémoides (infection, hypoxie, hémolyse...) ;
- l'absence d'anomalies chromosomiques constitutionnelles responsables d'hématopoïèse instable [2].

L'atteinte cutanée est l'une des particularités de la leucémie aiguë du nouveau-né, elle est faite de macules, papules, nodules enchâssés dans le derme, mesurant quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre, répartis au hasard sur l'ensemble du corps, de coloration rouge à violet, cela réalise un tableau clinique connu sous le terme de *Blueberry Muffin Baby* surtout observé dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) [3].

Chez notre patient, les lésions cutanées sont le signe d'appel majeur qui a motivé la famille à consulter. À l'examen clinique, on retrouve des lésions cutanées type papulonodules violacés disséminés sur tout le corps comparativement à celles décrites dans la littérature ; associées à une gingivorragie, une détresse respiratoire et une hépatosplénomégalie. À l'hémogramme, il y a une hyperleucocytose avec la présence de blastes circulants. Le bilan biochimique objective un syndrome de lyse tumorale. Cela nous a permis d'évoquer fortement le diagnostic de leucémie aiguë néonatale. Bien qu'il s'agisse d'une présentation typique, on peut évoquer quelques diagnostics différentiels. Devant une thrombopénie néonatale associée à une hyperleucocytose et une hépato-splénomégalie on doit éliminer une fœtopathie virale (cytomégalovirus, rubéole, herpès) ou parasitaire (toxoplasme). Les sérologies virales et TORCH chez le nouveau-né et la maman sont négatives. Ce tableau initial doit également faire éliminer une réaction leucémoïde (dans le cadre d'une infection, d'une hypoxie ou d'une maladie hémolytique sévère du nouveau-né), un neuroblastome de stade IV avec atteinte métastatique hépatique et cutanée, une prolifération clonale B dans le cadre d'une infection à VIH ou une réaction « leucémie transitoire » chez un nouveau-né porteur d'une trisomie 21. La maladie hémolytique est écartée devant un bilan d'hémolyse normal. Le bilan radiologique a confirmé l'absence de toute tumeur solide ou de métastases.

Les LA du nouveau-né se distinguent également de celles de l'enfant par des anomalies chromosomiques dont la plus fréquente est la translocation $t(4, 11)$, qui est pour la plupart des auteurs, un facteur de mauvais pronostic ainsi que toute anomalie incluant le $11q23$ [4]. Le gène *MLL*, localisé en $11q23$, est remanié dans ces translocations qui entraînent la production de protéines hybrides ayant un impact sur la croissance et la différenciation des lignées granuleuses et monocytaires. Les facteurs incriminés dans la survenue de ces événements génétiques in utero (facteurs alimentaires et environnementaux notamment) sont encore mal définis [4]. L'étude cytogénétique n'a pas été réalisée faute de moyens ce qui ne nous a pas permis d'éliminer une éventuelle anomalie chromosomique associée malgré le morphotype normal de notre patient. Devant le tableau clinique évocateur, la confirmation est portée par le frottis sanguin et le myélogramme (Fig. 1) dont l'aspect cytologique, cytochimique et immunophénotypique est celui d'une leucémie aiguë myéloblastique de type LAM5, selon le FAB (Fig. 2). Grundy et al. ont proposé une prise en charge conservatrice des nouveau-nés présentant des leucémies néonatales, sauf s'il existait un facteur de mauvais pronostic, notamment une translocation $11q23$ ou une pathologie évolutive. Du fait de la rareté de cette pathologie, le pronostic reste difficile à établir. Il est donc important de ne pas soumettre un nouveau-né aux risques de la chimiothérapie ; elle est conseillée en cas de progression de la pathologie, de lésions menaçant directement le pronostic vital et en cas de récurrence après rémission spontanée [5]. Il a été décidé chez notre patient un traitement conservateur sous surveillance clinico-biologique rigoureuse sans prévoir de chimiothérapie. L'évolution a été fatale après 13 jours de vie dans un tableau de septicémie.

Conclusion

La leucémie aiguë néonatale est une affection exceptionnelle, mais fréquemment associée à des localisations cutanées. Ce cas clinique rappelle qu'il faut toujours évoquer une leucémie néonatale devant un Blueberry Muffin Baby syndrome malgré sa rareté après avoir éliminé toutes les étiologies pouvant donner lieu à des atteintes cutanées. Le pronostic des LA néonatales reste globalement très sombre, et généralement moins bon que chez les enfants plus âgés surtout qu'il n'existe toujours pas de consensus thérapeutique [5].

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Chessells JM, Richards S, Bailey CC, Lilleyman Eden OB. For the MRC working party on childhood leukemia: all in infancy: experience inUK national trials. *Med Pediatr Oncol* 1992; 20:372.
- [2] Bacchetta J, Douvillez B, Warin L, Girard S, Pagès P, Rebaud P, et al. Leucémie aiguë néonatale et Blueberry Muffin syndrome : à propos d'un cas spontanément régressif. *Arch Pediatr* 2008;15:1315–9.
- [3] Mélanie D, et al. Leucémie monoblastique aiguë congénitale : à propos d'un cas et diagnostic différentiel. *Ann Biol Clin (Paris)* 2011;69(2):208–11.
- [4] Pui CH, Behm FG, Downing JR, et al. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994;12:909–15.
- [5] Grundy RG, Martinez A, Kempinski H, et al. Spontaneous remission of congenital leukemia: a case for conservative treatment. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:252–5.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



CAS CLINIQUES

Maladie de Niemann-Pick de type B révélée par des histiocytes bleu de mer : à propos d'un cas



Niemann-Pick disease type B revealed by sea blue histiocytes: A case report

I. Tlamçani*, S. Benjelloun, G. Yahyaoui,
N. Benseddik, M.H. Amrani

Laboratoire d'hématologie, laboratoire central d'analyses médicales, CHU Hassan II, BP 30000, Fès, Maroc

Reçu le 14 mai 2013 ; accepté le 25 juillet 2013

KEYWORDS

Niemann-Pick type B;
Splenomegaly;
Sea blue histiocytes;
Myelogram;
Sphingomyelinase

Summary Niemann-Pick type B is a rare autosomal recessive syndrome storage disease. It is due to a total or partial deficiency in sphingomyelinase, causing a buildup of sphingomyelin in reticulo-endothelial cellular system. The diagnosis is based on examining enzyme deficiency. The clinical context and careful examination of the blood and bone marrow may therefore be a key step in the diagnostic process. In this respect, we mention a rare case of a young woman aged 20 years; the latter suffers from thrombocytopenia associated with splenomegaly that justified realization of myelogram which discovered, after staining with May-Grünwald-Giemsa (MGG), the presence of numerous histiocytes blue infiltrating the bone marrow. With these clinical and cytological data in mind, the diagnosis of Niemann-Pick disease type B is raised. This is made valid by measuring the enzymatic activity of acid sphingomyelinase lysosomal which is decreased.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

MOTS CLÉS

Niemann-Pick de type B ;
Splénomégalie ;
Histiocytes bleu de mer ;
Myélogramme ;
Sphingomyélinase

Résumé La maladie de Niemann-Pick est une maladie lysosomale rare à transmission autosomique récessive. Elle est due à un déficit total ou partiel en sphingomyélinase, entraînant une accumulation de sphingomyéline dans les cellules du système réticulo-endothélial. Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du déficit enzymatique. Le contexte clinique et l'examen attentif du sang et de la moelle constituent une étape fondamentale dans l'orientation diagnostique et le dépistage précoce. Nous rapportons ici le cas rare d'une jeune femme de 20 ans présentant une splénomégalie associée à une thrombopénie ayant justifié la réalisation d'un myélogramme qui a objectivé, après coloration de May-Grünwald-Giemsa

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : tlemcanimane@hotmail.com (I. Tlamçani), salmabenj@hotmail.com (S. Benjelloun), ghitayahyaoui2007@gmail.com (G. Yahyaoui), b-najoua@hotmail.com (N. Benseddik), moncef34@hotmail.com (M.H. Amrani).

0923-2532/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immbio.2013.07.003>

(MGG), la présence de nombreux histiocytes bleu infiltrant la moelle osseuse. Devant ces données cliniques et cytologiques, le diagnostic de la maladie de Niemann-Pick de type B est évoqué. La confirmation est apportée par la mesure de l'activité enzymatique de la sphingomyélinase acide lysosomale qui est diminuée.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Les maladies lysosomales, appelées aussi maladies de surcharge, constituent un groupe hétérogène, caractérisé par une accumulation lysosomale de macromolécules non digérées responsables d'une augmentation de la taille de ces organelles, entraînant un dysfonctionnement cellulaire et des anomalies cliniques. Les maladies lysosomales ont été longtemps classées en fonction du substrat accumulé telles que les mucopolysaccharidoses, les glycoprotéinoses, les mucopolipidoses et les sphingolipidoses.

La maladie de Niemann-Pick est une maladie de surcharge rare, à transmission autosomique récessive. C'est une pathologie bénigne caractérisée par l'association d'une splénomégalie, une thrombopénie et la présence de macrophages spumeux au niveau de la moelle osseuse. Le diagnostic de certitude est porté par la mesure de l'activité de la sphingomyélinase acide lysosomale qui doit être diminuée. Nous décrivons ici le cas d'une patiente atteinte de maladie de Niemann-Pick de type B révélée par l'infiltration de la moelle osseuse par des histiocytes de couleur bleue appelés « histiocytes bleu de mer » [1].

Observation

Il s'agit d'une jeune femme de 20 ans issue d'un mariage consanguin de premier degré, consultant pour asthénie et distension abdominale évoluant depuis l'enfance. L'examen clinique retrouve une énorme splénomégalie dépassant l'ombilic de 4 cm et des taches purpuriques au niveau des membres inférieurs. L'examen pleuropulmonaire, cardiovasculaire et neuromusculaire sont sans particularités. La numération formule sanguine objective un taux d'hémoglobine à 11,5 g/dl et une thrombopénie à 68 000 éléments/mm³. Les dosages sanguins du cholestérol total, des triglycérides, du LDL-cholestérol et du HDL-cholestérol sont normaux. Les sérologies virales (HBS, HCV et HIV) sont négatives. L'électrophorèse de l'hémoglobine et le test de résistance globulaire sont également normaux. Il n'y a pas d'anomalies cellulaires sur le frottis sanguin. Le myélogramme retrouve une moelle osseuse hypercellulaire avec des mégacaryocytes normaux, infiltrée par de nombreux histiocytes bleu après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) (Fig. 1 et 2). La tomodensitométrie abdominopelvienne retrouve une splénomégalie homogène sans hépatomégalie ou adénopathie associées. La radiographie thoracique ne montre pas d'atteinte pulmonaire ni d'adénopathies médiastinales.

À la lumière des données cliniques, biologiques et radiologiques, le diagnostic de Niemann-Pick est fortement évoqué, ce qui nous a poussé à mesurer l'activité

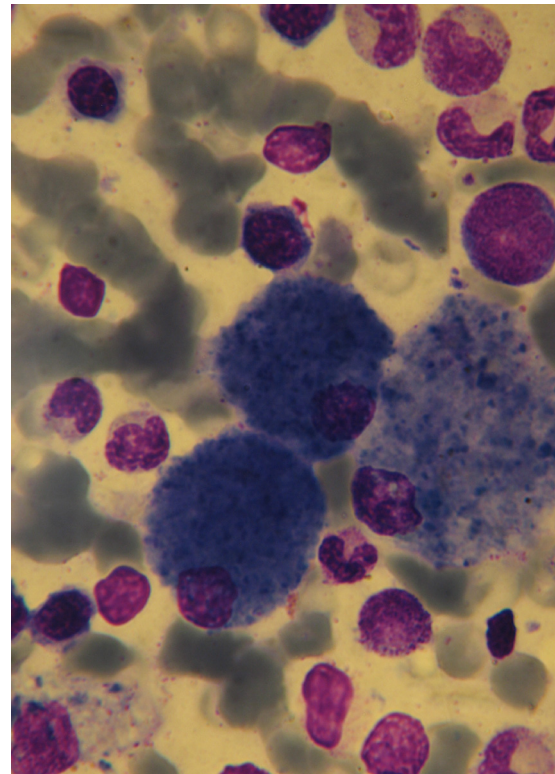


Figure 1 Frottis médullaire coloré au MGG montrant des histiocytes bleu de mer infiltrant la moelle osseuse, vu au grossissement ($\times 100$).

de la sphingomyélinase acide lysosomale au niveau du sang périphérique. Elle est significativement diminuée : 4,32 nmol/mg, (la valeur normale est supérieure à 9,85 nmol/mg). La patiente ne présente aucun symptôme neurologique central et tolère bien sa maladie, ce qui suggère que la maladie de Niemann-Pick est de type B. La patiente a bénéficié d'une transfusion de deux culots plaquettaires sans aggravation ultérieure de ses symptômes. Compte tenu des résultats, on suppose que la présence des histiocytes bleu au niveau de la moelle osseuse est secondaire à la maladie de Niemann-Pick de type B [1,2].

Commentaires

La maladie de Niemann-Pick est une maladie métabolique congénitale à transmission autosomique récessive. Elle comprend plusieurs types (A, B, C, D). Le type B est lié à des mutations du gène *SMPD1* situé au locus 11p15, codant pour la sphingomyélinase acide, une hydrolase lysosomale acide

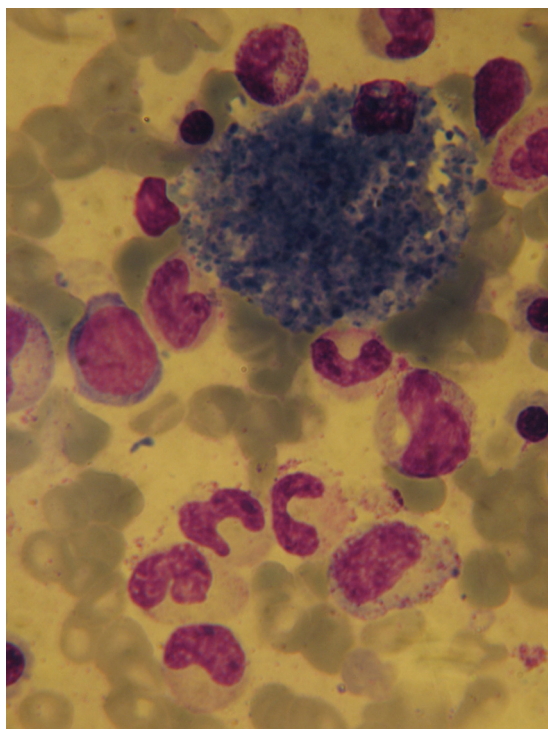


Figure 2 Frottis médullaire coloré au MGG, vu au grossissement ($\times 100$), montrant la structure d'un histiocyte bleu infiltrant la moelle osseuse.

impliquée dans la dégradation de la sphingomyéline. Ce type est caractérisé par l'association d'une splénomégalie, une thrombopénie secondaire à l'hypersplénisme et la présence, le plus souvent, d'histiocytes de couleur bleue au niveau de la moelle osseuse [3]. Ces derniers sont des macrophages à noyau excentré, à cytoplasme étendu, vacuolé, contenant des granules de lipofuscines ou de céroïdes (Fig. 2). Notre patiente est issue d'un mariage consanguin de premier degré ce qui nous a guidé à l'hypothèse d'une pathologie congénitale. La cytologie est une étape importante dans l'orientation diagnostique ; la présence et l'aspect particulier des histiocytes au niveau médullaire nous ont conduits à évoquer le diagnostic d'une maladie de surcharge. Les histiocytes retrouvés sont de taille moyenne à grande, à noyau le plus souvent excentré, rarement central, à cytoplasme étendu, vacuolaire donnant un aspect spumeux aux cellules et contenant des granules bleu (à la coloration de MGG). Ils ont d'abord été décrits en 1970 par Silverstein qui a rapporté le « syndrome des histiocytes bleu de mer » observé dans plusieurs maladies métaboliques lipidiques, et qui est généralement classé comme primaire ou secondaire [3,4]. Le terme « syndrome des histiocytes bleu de mer » est réservé aux situations où il y'a une accumulation significative de ces cellules dans de multiples organes en absence d'étiologie évidente. Ces histiocytes bleu peuvent se voir dans différentes pathologies telles que les hémopathies myéloprolifératives, les syndromes myélodysplasiques, les neutropénies auto-immunes et le purpura thrombopénique auto-immun. On les retrouve également dans d'autres maladies lysosomales et dyslipidoïdoses ; dans ce cas, leur

présence est secondaire à une maladie de surcharge [4]. Devant les données cliniques et cytologiques de notre patiente, le diagnostic de la maladie de Niemann-Pick était fortement évoqué. La mesure de l'activité de la sphingomyélinase acide est l'examen clé pour confirmer le diagnostic [1]. Elle a été réalisée par la suite et était significativement basse. C'est un examen simple qui se fait sur un prélèvement du sang périphérique sur tube EDTA (éthylène diamine tétra-acétique). Lorsque l'activité de la sphingomyélinase acide fait défaut, la sphingomyéline ne peut être dégradée et s'accumule en conséquence dans les histiocytes. Donc, leur présence est secondaire à la maladie de Niemann-Pick comparativement à plusieurs cas décrits dans la littérature [5]. Compte tenu des résultats de l'examen clinique et paraclinique, de l'évolution bénigne à long terme et de l'absence de signes neurologiques, le diagnostic de la maladie de Niemann-Pick de type B est posé après avoir écarté les formes A et C de la maladie [2,4,5].

Conclusion

La présence d'histiocytes bleu au niveau de la moelle osseuse d'un adulte associée à une splénomégalie et une thrombopénie doit faire penser au diagnostic de la maladie de Niemann-Pick malgré sa rareté et après avoir éliminé d'autres éventuels diagnostics, d'où la nécessité de mesurer l'activité enzymatique leucocytaire de la sphingomyélinase acide [1].

Il n'y a pas actuellement de traitement spécifique de cette pathologie, ce qui motive la recherche vers les tentatives de mise au point de thérapie génique ou de thérapie enzymatique recombinante substitutive comme cela existe désormais pour d'autres maladies lysosomales : maladie de Gaucher, maladie de Fabry, les mucopolysaccharidoses de type I, II et VI, et la glycogénose de type II.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Schuchman EH, Desnick R. Niemann Pick disease type A and B: acid sphingomyelinase deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: MC Graw Hill; 1995. p. 2601–24.
- [2] Osamu S, Masafumi A. Secondary sea-blue histiocytosis derived from Niemann-Pick disease. *J Clin Exp Hematopathol* 2007;47:19–21.
- [3] Alizon C, et al. Maladie de Niemann-Pick de type B: description clinique de trois cas familiaux. *Rev Med Interne* 2010;31: 562–5.
- [4] Anna C, Doretto P, Bembi B. Sea-blue histiocytes in the bone marrow of a patient with Niemann-Pick disease type B. *Haematologica* 2001;86:896.
- [5] Candoni A, Grimaz S, Doretto P. Sea-blue histiocytosis secondary to Niemann-Pick type B: a case report. *Ann Hematol* 2001;80:620–2.



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



LETTRES À LA RÉDACTION

Using new cut-off for lipidic parameters to predict development of affected arteries in patients with acute coronary syndrome



Pour de nouvelles valeurs seuils des paramètres lipidiques pour la prédiction des artères touchées chez les patients avec syndrome coronaire aigu

KEYWORDS

Acute coronary syndrome;
 Artery disease;
 Lipid profile;
 New cut-off

MOTS CLÉS

Syndrome coronaire aigu ;
 Artériopathie ;
 Profil lipidique ;
 Nouvelle valeur seuil

Introduction

Acute coronary syndromes (ACS) remain the major cause of mortality and morbidity in the modern world. Thus, considering the patient's clinical characteristics, lipid profile could lead to the most tangible benefit for assessing the risk of ACS development [1].

In fact, lipid profile was considered a major indicator of atherothrombotic diseases. Low-density lipoprotein (LDL) and depressed high-density lipoprotein (HDL) levels represent the well-known cardiovascular risk factors [2,3]. Other lipid parameters represent an interesting role in the development of cardiovascular diseases (CVD). The measurement of apolipoprotein B (ApoB), the sole apolipoprotein in LDL, and apolipoprotein A (ApoA), the protein component of HDL, may add valuable information in the clinical

assessment of susceptibility to coronary heart disease (CHD) [4]. Lipoprotein (a) (Lp (a)) is a heterogeneous lipoprotein that incorporates an LDL particles and the highly polymorphic ApoA which is linked to the ApoB moiety of LDL [5]. One of the potential mechanisms that explains the relation of Lp (a) to CHD is its homology to plasminogen [6,7]. The aim of the present study was to determine new cut-off of lipid profile in patients hospitalized for acute coronary syndrome and its association to the degree of disease.

Patient and methods

Study population

Patients hospitalized with ACS were recruited from the coronary care unit of department of cardiology of Military hospital of Tunis. The group is composed of 122 patients (77 men and 45 women) with mean age 63.86 ± 10.06 years. ACS was defined either as an unstable angina or as an acute myocardial infarction which was diagnosed on the basis of the presence of chest pain and typical ischemic electrocardiographic changes. Stable angina was defined on the basis of the presence of typical and stable chest pain during effort, a positive treadmill exercise test, and obstructive coronary lesions as determined by coronary angiography. The extent of coronary artery disease (CAD) was assessed by the number of diseased coronary vessels. We subdivided study group according to the number of affected arteries from one to three. Physical and clinical data were noted in patient's files and include body mass index (BMI) calculated as weight (kg)/height (m^2), cigarettes smoking, systolic and diastolic blood pressure and family history of CVD. Seventy-two patients have hypertension confirmed by anti-hypertensive drug use or blood pressure superior to 140/90 mmHg recently noted. Fifty-nine are type 2 diabetics defined according to the World Health Organization criteria [8]. Sixty-five presented dyslipidemia defined as increased levels in one or more lipid parameters (total cholesterol > 5.2 mmol/L; LDLc > 3.40 mmol/L; triglycerides [TG] > 1.70 mmol/L; HDLc < 1.05 mmol/L) and use of hypolipemiant drugs. None of patients had infectious disease, renal or hepatic failure or was administrated any vitamin supplementation during a study period. All subjects accepted to participate to the study.

Table 1 Clinical baseline data according to number of affected arteries in patients with acute coronary syndromes.

	Number of affected arteries			P
	One artery (n = 50)	Two arteries (n = 33)	Three arteries (n = 39)	
Age (year)	64.18 ± 10.53	61.24 ± 9.77	65.66 ± 9.47	NS
Gender (M/F)	28/22	23/10	26/13	NS
BMI (kg/m ²)	26.33 ± 4.30	26.87 ± 3.58	26.76 ± 3.48	NS
Tobacco	26 (52%)	23 (69.7%)	22 (56.4%)	NS
Diabetes mellitus	21 (42%)	18 (54.4%)	20 (51.3%)	NS
Hypertension	28 (56%)	19 (57.6%)	25 (64.1%)	NS
Dyslipidemia	25 (50%)	19 (57.6%)	21 (53.8%)	NS
FH CAD	16 (32%)	7 (21.2%)	8 (20.5%)	NS

M: male; F: female; FH CAD: family history of coronary artery disease; BMI: body mass index.

Lipid profile

Total cholesterol (TC), TG and cholesterol of high-density lipoprotein (HDLc) were measured by using a colorimetric enzymatic method in a Beckmann automatic analyzer LX20. Cholesterol of low-density lipoprotein (LDLc) was calculated by Friedwald formula: $LDLc = TC - (HDLc + TG/2.18)$ for TG is less than 4.5 mmol/L.

ApoA, ApoB and Lp (a) were analyzed by immunonephelometric method on BNII Nephelometer Analyser (Dade Behring, Marbourg, Germany) and expressed in g/L.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS for Windows 20.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values were reported as means and standard deviation, or percents. The difference between groups was compared by independent samples *t*-test for continuous variables and by Chi² tests for categorical variables. To evaluate the association between studied factors and number of affected arteries, the means were compared using ANOVA test. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Multivariate analysis was also performed. To assess predictor factors of events (the probability to develop a new affected arteries), logistic regression

was performed by backward elimination [9] and models verified with Hosmer-Lemeshow test. The dependent variable was the number of affected arteries dichotomized in one and two or more than two affected arteries and the independent variables were the significant variables in the univariate analysis.

Results

Baseline characteristics subscribed for patients showed elevated frequencies in hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes and cigarettes smoking (59%, 53.3%, 48.4%, 58.2% respectively). Of 122 patients, there were just three of them who consumed alcohol (2.5%) and 25.4% had familial history of CVD.

Distribution of studied anthropometric risk factors, according to the number of affected arteries, is presented in Table 1. No statistically significant differences were found between patients with one ($n = 50$), two ($n = 33$) or three ($n = 39$) affected vessels (Table 1). This result attenuates the effect of such anthropometric risks on the distribution of biological factors according to affected arteries.

Comparison of biological factors showed statistically significant differences between patients with one affected artery and those with three TC ($P < 0.01$), LDL ($P < 0.05$) and

Table 2 Comparison of biological parameters according to the number of affected arteries in patients with acute coronary syndromes.

	Number of affected arteries			P
	One artery (n = 50)	Two arteries (n = 33)	Three arteries (n = 39)	
TC (mmol/L)	4.62 ± 1.47	4.32 ± 1.22	4.81 ± 1.09	< 0.01 ^{a,b}
HDLc (mmol/L)	1.01 ± 0.29	0.89 ± 0.29	1.04 ± 0.37	NS
LDLc (mmol/L)	2.85 ± 1.26	2.66 ± 0.94	3.35 ± 1.18	< 0.05 ^{a,b}
TG (mmol/L)	1.39 ± 0.64	1.71 ± 1.02	1.31 ± 0.75	NS
ApoA (g/L)	1.25 ± 0.24	1.20 ± 0.24	1.23 ± 0.26	NS
ApoB (g/L)	0.97 ± 0.31	1.03 ± 0.32	0.98 ± 0.31	NS
Lp (a) (g/L)	0.30 ± 0.29	0.31 ± 0.23	0.49 ± 0.17	< 0.01 ^{a,b}

NS: non significant; TC: total cholesterol; HDLc: cholesterol of high-density lipoprotein; LDLc: cholesterol of low-density lipoprotein; TG: triglycerides; ApoA: apolipoprotein A; ApoB: apolipoprotein B; Lp (a): Lipoprotein (a).

^a Difference between patients with two and those with three arteries.

^b Difference between patients with one and those with three arteries.

Lp (a) ($P < 0.01$). The same result was found for patients with two arteries compared to those with three arteries who represent elevated levels (Table 2).

As no differences were found between patients with one and those with two affected arteries, we regrouped these two subgroups into one group to compare it to those with three affected arteries. For clinical features, no differences were found even when we regrouped patients with one and two arteries. For biological markers, we found statistically significant elevated levels of TC ($P < 0.01$), LDLc ($P < 0.05$) and Lp (a) ($P < 0.001$) (Table 3). Receiver operating characteristic curve (ROC) was used to determine new cut-off for significant factors, from which patients with one or two affected arteries are at risk to develop more affected arteries. We found lower new cut-off for TC (4.25 mmol/L vs 5.2 mmol/L), LDLc (2.70 mmol/L vs 3.40 mmol/L) and Lp (a) (0.27 g/L vs 0.30 g/L) (Fig. 1a–c).

Discussion

As demonstrated in many studies, lipid profile have important role in atherosclerosis. In the present study, we found elevated LDL but lower HDL in patients with multi-affected arteries. Korhonen et al. [10] demonstrated that high levels of LDL are associated with an increased risk of CAD, and the more vessels obstructed, the higher is the serum LDL level. Epidemiologic surveys have observed that elevated levels of LDLc are associated with increased risk of CHD [11]. Plasma levels of ox-LDL are associated with atherosclerotic CVD, and those in patients with new-onset type of ACS are significantly elevated and then decrease during the first week [12]. In our study, we determined new cut-off for LDLc and we found lower level than usual values in laboratory (Table 4). One of the best-known risk factors and a primary target of therapy is elevated concentration of LDLc. Despite many studies indicating the need for determination of LDLc in patients at risk of ACS, it is more and more often suggested that focusing solely on LDLc is not an optimal diagnostic and therapeutic strategy. This attitude is driven by several important limitations associated with LDLc. Triglyceride-rich lipoproteins, including very low-density lipoproteins (VLDL) and intermediate-density lipoproteins (IDL), also exert atherogenic properties. Patients, who achieved a reduction in LDLc even below 70 mg/dL, still are at the so-called residual risk of atherothrombotic events. The coexistence of high TG and low HDLc, called atherogenic dyslipidemia, is associated with elevated ApoB concentration. While the role of apolipoproteins in coronary risk assessment is an evolving debate, the ApoB/ApoA-I ratio is becoming increasingly important [13]. In fact, an increased proportion of small, dense LDL particles may be more susceptible to oxidative modification [14,15]. Although HDL levels did not represent a significant protective effect in our study, it must be implicated in the screening of patients at higher risk as we found that 58.9% of patients had lower HDL levels. As regards the variable TC/HDL and its relationship with the presence and severity of CAD, clinical and angiographic studies have correlated it with the progression or regression of CAD (Table 5). Therefore, this finding reinforces the importance of the measurement of the TC/HDL ratio as an individual risk

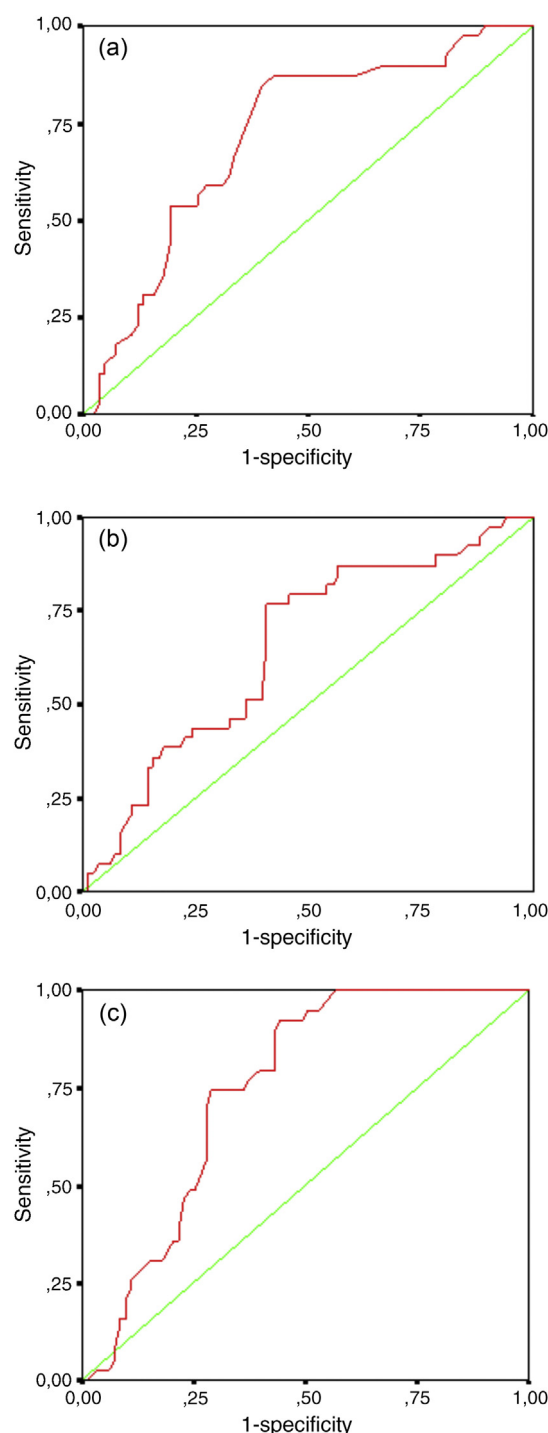


Figure 1 a: receiver operating characteristic curve (ROC) of total cholesterol (TC) in patients with acute coronary syndromes (ACS); b: ROC curve of cholesterol of low-density lipoprotein (LDLc) in patients with ACS; c: ROC curve of lipoprotein (Lp) (a) in patients with ACS.

factor for CAD, as well as an indicator of extent and severity of the disease, even in the presence of cholesterol levels considered normal, thus suggesting that the imbalance between TC and HDL levels plays a more important role in the pathophysiology of atherogenesis. It is important to consider that the atheroprotective function of HDL is not

Table 3 Comparison of biological parameters after regrouping patients with one and two affected arteries.

	Number of diseased vessels		P
	One or two arteries (n = 83)	Three arteries (n = 39)	
TC (mmol/L)	4.31 ± 1.29	5.15 ± 1.15	0.001
HDLc (mmol/L)	0.97 ± 0.29	0.88 ± 0.37	NS
LDLc (mmol/L)	2.78 ± 1.15	3.35 ± 1.18	0.012
TG (mmol/L)	1.52 ± 0.82	1.31 ± 0.75	NS
ApoA (g/L)	1.23 ± 0.24	1.23 ± 0.26	NS
ApoB (g/L)	1.00 ± 0.31	0.97 ± 0.31	NS
Lp (a) (g/L)	0.31 ± 0.27	0.49 ± 0.17	10 ⁻³

NS: non significant; TC: total cholesterol; HDLc: cholesterol of high-density lipoprotein; LDLc: cholesterol of low-density lipoprotein; TG: triglycerides; ApoA: apolipoprotein A; ApoB: apolipoprotein B; Lp (a): Lipoprotein (a).

Table 4 New cut-off determined for studied parameters.

Parameter	New cut-off	Sensitivity (%) IC (95%)	Specificity (%) IC (95%)	PPV (%) IC (95%)	NPV (%) IC (95%)
LDLc (mmol/L)	2.70	76.9 [60.3–88.3]	59.0 [47.7–69.5]	46.9 [34.5–59.7]	84.5 [72.1–92.2]
TC (mmol/L)	4.25	87.2 [71.8–95.2]	57.8 [46.5–68.4]	49.3 [37.1–61.5]	90.6 [78.6–96.5]
Lp (a) (g/L)	0.27	92.3 [78.0–98.0]	55.4 [44.1–66.2]	49.3 [37.5–61.2]	93.9 [82.1–98.4]

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; IC: interval of confidence 95^e percentile; LDLc: cholesterol of low-density lipoprotein; TG: triglycerides; Lp (a): lipoprotein (a).

restricted to reverse cholesterol transport, but can also transport antioxidant enzymes, break down oxidized lipid fractions, and neutralize their proinflammatory effects. There is growing evidence that targeting other lipids, such as TG and HDLc, is an important way to reduce the residual cardiovascular risk [16].

Hypertriglyceridemia was also demonstrated to be associated to modifications in homeostasis susceptible to provide thrombosis that have an important role in CVD but its place as a risk factor is in debate [17]. The association of other factors to dyslipidemia may enhance the proliferation of atherosclerosis and so the CVD. Although ApoB is demonstrated to be superior to LDLc as an index of lipid-related risk of vascular disease [4] and the ApoB/A ratio is strong predictor of coronary events in middle-aged men and women [18], we did not found variation in ApoA and ApoB levels according to affected arteries. The current guideline for lipid management to prevent CAD defines the absolute LDLc level as a treatment target, but the qualitative characteristics of

the LDL may also need to be monitored in the future. It suggested that LDLc/ApoB ratio may become a significantly important tool in the risk stratification of patient with CAD due to the simplicity of measurement and calculation in clinical settings [19].

Significant elevated levels were found in Lp (a). In fact, Lp (a) concentrations have been linked with CHD across a wide spectrum of epidemiologic studies [20,21]. In our study, we found elevated concentrations in patients with multi-affected arteries and that the new determined cut-off was lower than usual value. Plasma concentrations of ox-Lp (a) significantly increased in both ACS and stable CAD patients. The increased ox-Lp (a) concentrations might be one of the major contributing factors for the occurrence of ACS and its concentrations may represent a better biochemical risk marker for ACS than plasma Lp (a) [22,23].

In the present study, determined new cut-off, from which patients with one or two affected arteries are at risk to develop more affected arteries, are lower than used cut-off

Table 5 Adjusted odds ratios for significant parameters by univariate analyses.

Parameter	New cut-off	OR	IC 95%	P
Lp (a) (g/L)	0.27	14.91	4.25–52.32	10 ⁻³
LDLc (mmol/L)	2.70	4.80	2.02–11.40	10 ⁻³
TC (mmol/L)	4.25	9.33	3.31–38.61	10 ⁻³

IC: interval of confidence 95^e percentile; LDLc: cholesterol of low-density lipoprotein; TG: triglycerides; Lp (a): lipoprotein (a).

for lipid profile. This result can be taken into consideration to help preventing complications in ACS even in treated patients.

Conclusion

Findings of this study reinforce the need to assess lipid profile in ACS at admission to classify patients at high risk.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Acknowledgments

This work was supported by grant from the Ministry of Defense Military hospital of Tunis, Department of Biochemistry. We would like to thank all participants to the study.

References

- [1] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:188–97.
- [2] Toth PP, Davidson MH. Therapeutic interventions targeted at the augmentation of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:374–9.
- [3] Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999;144:285–301.
- [4] Christa M, Hannelore L, Wilfried M, Wolfgang K. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Eur Heart J* 2005;26:271–8.
- [5] Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989;246:904–10.
- [6] Simon DI, Fless GM, Scanu AM. Tissue type plasminogen-activator binds to and is inhibited by surface-bound Lp (a) and LDL. *Biochemistry* 1991;30:6671–7.
- [7] Galvano F, Malaguarnera M, Vacante M, Motta M, Russo C, Malaguarnera G, et al. The physiopathology of lipoprotein (a). *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:866–75.
- [8] Luton JP. *Endocrinologie nutrition et maladies métaboliques*. Paris: Flammarion; 1999 [ISBN: 2-257-15059-7].
- [9] Preux PM, Dermatt PO, Pema A. Qu'est ce qu'une régression logistique? *Rev Mal Respir* 2005;22:159–62.
- [10] Korhonen T, Savolainen MJ, Ikaheimo M. Association of lipoprotein cholesterol and triglycerides with the severity of coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis* 1996;127:213–20.
- [11] La Rosa JC. Understanding risk in hypercholesterolemia. *Clin Cardiol* 2003;26:S:3–6.
- [12] Michinori I, Koichi O, Futoshi T, Kenji K, Hideya Y, Kotaro S, et al. Plasma levels of oxidized low density lipoprotein are associated with stable angina pectoris and modalities of acute coronary syndrome. *Int Heart J* 2008;49:515–24.
- [13] Magdalena K, Marek K, Anna S, Marcin S, Karolina O, Tomasz F, et al. Value of C-reactive protein as a risk factor for acute coronary syndrome: a comparison with apolipoprotein concentrations and lipid profile. *Mediators Inflamm* 2012;2012:10, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/419804> [Article ID 419804].
- [14] Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82:495–506.
- [15] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915–24.
- [16] Rafaela AP, Marçal de Oliveira H, Luis Cláudio LC, Gilson SF, Ana M, Teixeira L. Lipid profile and severity of atherosclerotic disease in acute coronary syndrome. *Arq Bras Cardiol* 2008;90(1):24–9.
- [17] Foubert L, Dejagers S, Bruckert E. Facteurs lipidiques de risque de l'athérosclérose : qui traiter, quand et comment? *Ann Endocrinol* 1997;58:275–82.
- [18] Saeed S, Faramarz F, Mojtaba S, Gholamreza D, Mehran M, Nader F, et al. Tehran heart center. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2006;6:38.
- [19] Shigemasa T, Yuuki S, Takeo A, Hirofumi K, Shingo F, Hiroshi T, et al. LDLc/apolipoprotein B ratio may be a useful index that differs in statin-treated patients with and without coronary artery disease. *Int Heart J* 2011;52:343–7.
- [20] Erqou S, Kaptoge S, Emerging risk factors collaboration. Lipoprotein (a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and non vascular mortality. *JAMA* 2009;302:412–23.
- [21] Ragab MS, Selvaraj P, Sgoutas DS. Oxidized lipoprotein (a) induces cell adhesion molecule Mac-1 (CD 11b) and enhances adhesion of the monocyte cell line U937 to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis* 1996;123:103–13.
- [22] Wang JJ, Zhang CN, Meng Y, Han AZ, Gong JB, Li K. Elevated concentrations of oxidized lipoprotein (a) are associated with the presence and severity of acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta* 2009;408:79–82.
- [23] Wang JJ, Han AZ, Meng Y, Gong JB, Zhang CN, Li K, et al. Measurement of oxidized lipoprotein (a) in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease by 2 ELISAs: using different capture antibody against oxidized lipoprotein (a) or oxidized LDL. *Clin Biochem* 2010;43:571–5.

M. El Oudi^{a,*}

C. Bouguerra^b

Z. Aouni^a

A. Haggui^c

R. Bellaj^b

H. Haouala^c

C. Mazigh^a

^a Research unit UR 12/DN02, department of Biochemistry, Military hospital of Tunis, 1008 Montfleury, Tunisia

^b Biostatistics research unit, department of hospital's Hygiene, Military hospital of Tunis, 1008 Montfleury, Tunisia

^c Department of Cardiology, Military hospital of Tunis, 1008 Montfleury, Tunisia

* Corresponding author.

E-mail address: doc.mo@gmail.com (M. El Oudi)

Received 15 July 2013

Accepted 23 July 2013



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques de l'antigène carcino-embryonnaire



Immunoanalytical characteristics of carcinoembryonic antigen

C. Desbene*, O. Gaillard

Laboratoire de biochimie, pôle de biologie pathologie, centre hospitalier Le Mans, 194, avenue Rubillard, 72037 Le Mans cedex 9, France

Reçu le 23 mai 2013 ; accepté le 30 mai 2013

KEYWORDS

Carcinoembryonic antigen;
Colon;
Gastrointestinal tract;
Cancer

MOTS CLÉS

Antigène carcino-embryonnaire ;
Côlon ;
Tractus gastro-intestinal ;
Cancer

Summary Besides structural and physiological data of carcinoembryonic antigen, this paper points out the optimal conditions for sampling, assays and interpretation of results.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Après les caractéristiques structurales et physiologiques de l'antigène carcino-embryonnaire, les données pré-, per- et postanalytiques de son dosage sont abordées pour l'interprétation des résultats.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

L'antigène carcino-embryonnaire (ACE) a été décrit pour la première fois par Gold et Freedman en 1965 [1]. Il constitue un des marqueurs tumoraux les plus anciens utilisés en onco-biologie, mais sa structure n'est connue que depuis peu.

Analyte intact

Structure de l'analyte

L'ACE appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et s'apparente au groupe des molécules d'adhésion IgCAM. Il possède différentes protéines homologues, regroupées dans la famille des molécules d'adhésion cellulaires analogues à l'ACE (*CEA-related cell adhesion molecules* ou CEACAM) et qui seront détaillées ci-dessous.

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : cdesbene@ch-lemans.fr (C. Desbene),
ogaillard@ch-lemans.fr (O. Gaillard).

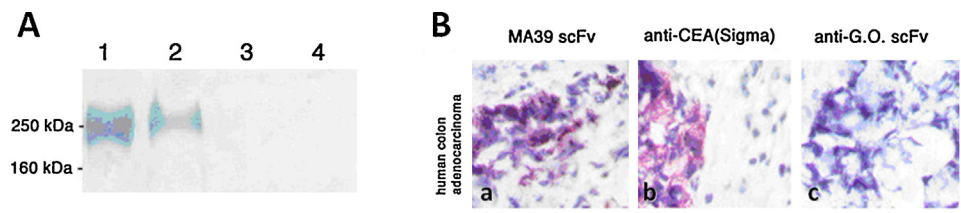


Figure 1 A. Étude par immunoblot d’une préparation d’ACE purifiée (1) et d’un extrait cellulaire de cellules LoVo (cellules de cancer colorectal humaines) (2) ; contrôles (3 et 4). B. Étude immuno-histochimique de l’expression de l’ACE sur des coupes de xénogreffes d’adénocarcinomes coliques humains chez la souris (a et b : utilisation de deux anticorps anti-ACE différents ; c : contrôle) [2].

L’ACE est une glycoprotéine monomère, dont la masse moléculaire relative est comprise entre 180 et 200 KDa (Fig. 1 [2]). Elle possède une mobilité électrophorétique dans la zone des β -globulines. Cette molécule est composée d’une chaîne polypeptidique unique et de résidus glycanes, qui représentent 45 à 60 % de la masse de la molécule. La variabilité des résidus glucidiques confère à la molécule d’ACE un niveau d’hétérogénéité de masse moléculaire inhabituellement élevé. La chaîne polypeptidique de l’ACE contient sept domaines Ig extracellulaires (Fig. 2) : le domaine N-terminal de la protéine, composé de 108 acides aminés (aa), s’apparente au domaine variable des Ig (domaine *IgV-like*). Un peptide signal de 34 aa (séquence L) précède ce domaine N-terminal et est clivé de la protéine lors de son acheminement vers la membrane. Les six autres domaines de la chaîne peptidique s’apparentent au domaine constant de type C2 des Ig (*IgC2-like*). Ces domaines peuvent être de type A, comportant 93 aa, ou de type B, comportant 85 aa. L’insertion de la molécule d’ACE dans la membrane cellulaire est assurée par un ancrage glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), appelé domaine M. L’ACE est probablement libéré de la membrane cellulaire par l’action de la phospholipase C ou D. Ce type d’ancrage semi pénétrant dans la membrane plasmique est également retrouvé pour d’autres

molécules de la famille CEACAM et pourrait expliquer la présence d’ACE circulant dans le sang.

La formule de domaine de l’ACE est donc : N-A1-B1-A2-B2-A3-B3-M. De plus amples informations sur la structure de l’ACE et de ses homologues peuvent être trouvées sur un site dédié à cette famille de molécules : <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>.

Récemment, la structure de la molécule d’ACE a pu être déterminée par des techniques de diffraction aux rayons X et aux neutrons. La chaîne peptidique de l’ACE apparaît comme un monomère d’une masse moléculaire de 150 KDa, et dont les dimensions font 20 nm par 8 nm, ces valeurs étant augmentées par les résidus glucidiques. La forme générale de la molécule s’apparente à celle d’un écouvillon, les domaines Ig étant inclinés les uns contre les autres avec un angle de 160° le long de l’axe de la molécule. Chaque domaine Ig adopte une conformation relativement cylindrique et est composé de deux feuillets β selon une structure en barillet β [3,4].

Variants moléculaires

La chaîne polypeptidique composant la molécule d’ACE contient 28 sites de N-glycosylation sur des résidus

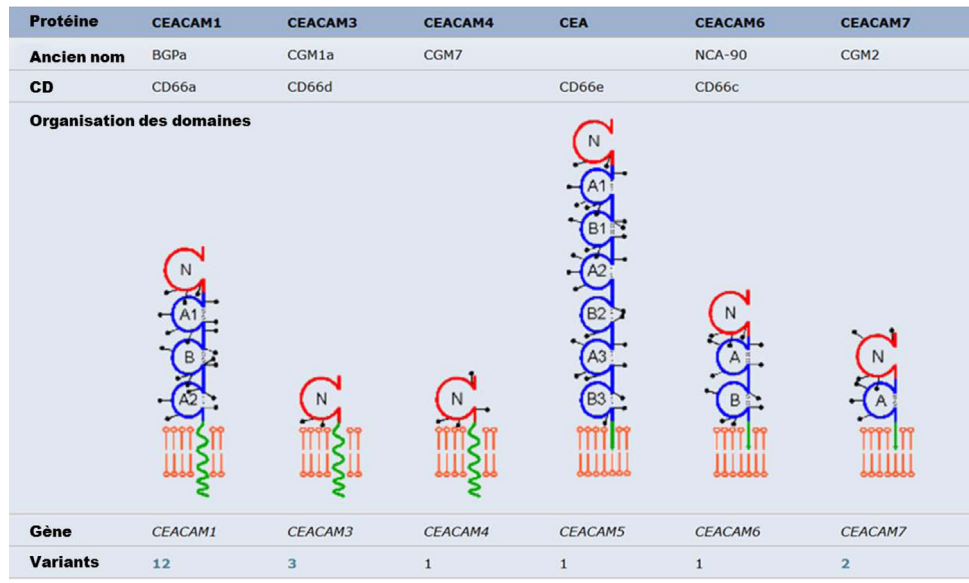


Figure 2 Structure de la chaîne peptidique de l’ACE et de ses homologues.
Source : CEA Homepage – <http://www.carcinoembryonic-antigen.de/>.

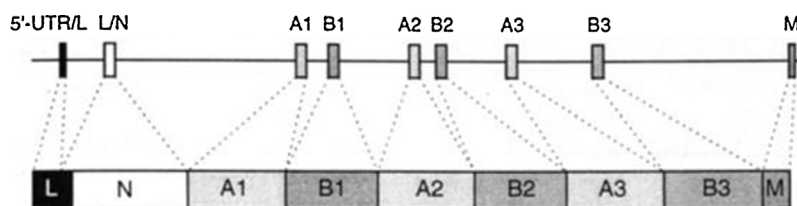


Figure 3 Organisation du gène de l'ACE et corrélation entre les domaines de la protéine et les différents exons du gène [6].

asparagine. Les résidus glycanes représentent 45 à 60 % de la masse de cette molécule et contiennent principalement du mannose, du galactose, de la N-acétylglucosamine, du fucose et de l'acide sialique. La variabilité des résidus glucidiques présents sur la molécule d'ACE lui confère un haut niveau d'hétérogénéité. Cette hétérogénéité se traduit d'abord par une variabilité de masse moléculaire inhabituellement élevée. De plus, divers variants de la molécule peuvent être mis en évidence, en particulier par des techniques de chromatographie d'affinité, utilisant notamment la concanavaleine A-sépharose [5].

Gène codant pour l'antigène carcino-embryonnaire

L'ACE est codé par le gène *CEACAM5*, localisé sur le chromosome 19 en position 19q13.2. Il appartient à une famille de 29 gènes ou pseudogènes (Fig. 3). Ces différents gènes de la famille de l'ACE peuvent être divisés en trois sous-groupes : le sous-groupe des *non-specific cross reacting antigens* (NCA), dans lequel se trouve le gène de l'ACE et qui comporte 12 membres, celui des *pregnancy specific glycoproteins* (PSG), contenant 11 membres, et un troisième sous-groupe de six gènes. Le groupe NCA comporte sept gènes pouvant être exprimés : *ACE*, *NCA* (NCA 50/90), *BGP*, *CGM1*, *CGM2*, *CGM6* (ou NCA95) et *CGM7*, ainsi que cinq pseudogènes ne pouvant être exprimés : *CGM8*, *CGM9*, *CGM10*, *CGM11* et *CGM12*. Le sous-groupe PSG contient 11 gènes pouvant tous être exprimés (certains variants alléliques de PSG7, PSG8 et PSG12 contiennent des codons stop dans l'exon codant pour la portion N-terminale et ne peuvent de ce fait pas être exprimés). Le troisième et dernier groupe est exclusivement composé de pseudogènes, dénommés *CGM13* à *CGM18*. Ces différents gènes et pseudogènes de la famille de l'ACE sont tous localisés sur une région de 1,8 Mpb, en position 19q13.2, entre les loci *CY2A* et *D19S15*.

La région promotrice du gène de l'ACE (ainsi que de ceux des autres membres de cette famille) ne contient pas d'éléments TATA et CCAAT. En revanche, elle présente des caractéristiques des gènes de ménage actifs, tels que des régions riches en bases G/C, des sites SP1, et des caractéristiques des gènes régulés au cours du développement. Le gène de l'ACE contient dix exons et neuf introns : chaque domaine *Ig-like* de la protéine est codé par un exon, l'information codant la partie L est répartie sur les deux premiers exons [6].

Activités biologiques et concentrations physiologiques de l'antigène carcino-embryonnaire

Comme l'alpha-fœtoprotéine (AFP), l'ACE appartient au groupe des antigènes carcino-embryonnaires, produits durant la période embryonnaire et fœtale. C'est donc une protéine oncofœtale, synthétisée essentiellement chez le fœtus, à partir de la neuvième semaine de gestation, au niveau du foie, du tractus gastro-intestinal et du pancréas. Il est également présent à des taux très faibles dans la muqueuse du côlon et dans la glande mammaire.

La synthèse de l'ACE est réprimée après la naissance et son taux sanguin s'effondre. Dans le sérum d'adultes sains, l'ACE est de ce fait à peine détectable. Chez l'adulte, l'ACE est présent à la surface du pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin grêle, du côlon, du rectum, du pancréas, du foie, du poumon et du sein. On le retrouve également au niveau du nasopharynx, du tractus urogénital et des glandes sudoripares. L'ACE est détectable dans le sérum de sujets sains, à des concentrations variables mais n'excédant pas en général 5 µg/L, celles-ci pouvant être modulées par différents éléments, en particulier le tabagisme (Tableau 1).

L'ACE peut entretenir des interactions homotypiques, avec une autre molécule d'ACE (interaction ACE/ACE), ou hétérotypiques, avec un autre membre de la famille

Tableau 1 Facteurs physiologiques et environnementaux modulant le taux d'ACE.

Facteur	Influence sur le taux d'ACE et interprétation des résultats
Sexe	La concentration d'ACE est plus élevée chez l'homme que chez la femme (valeur moyenne à 5,2 µg/L chez l'homme contre 3,5 µg/L chez la femme)
Âge	Les taux d'ACE s'élèvent au cours du vieillissement
Grossesse	La grossesse s'accompagne d'une augmentation des taux d'ACE (taux plus élevés au cours des deux premiers trimestres)
Tabac	Le tabagisme entraîne une augmentation des taux d'ACE (les taux d'ACE sont corrélés à l'intensité du tabagisme ; chez le fumeur, la valeur-seuil couramment admise est d'environ 10 µg/L)

CEACAM (ACE/BGP ou ACE/NCA), avec le collagène de type I ou avec certaines souches d'*E. coli*. Il peut ainsi participer aux phénomènes d'adhésion intercellulaire. Ces interactions font intervenir principalement le domaine N-terminal *IgV-like* et impliquent un des deux feuillets β sur le repliement Ig (appelée « face CFG »).

Plusieurs récepteurs à l'ACE ont été proposés, notamment un récepteur spécifique de 80 KDa, au niveau des cellules de Kupffer du foie, ou la galectine 3 (*galactoside binding lectin 3*), dans les lignées cellulaires de cancers coliques.

Son rôle physiologique reste encore à préciser. Il pourrait être impliqué dans :

- la différenciation cellulaire et tissulaire au cours de l'embryogenèse ;
- la reconnaissance et la régulation de la flore bactérienne du côlon.

L'ACE est également impliqué dans le développement des tumeurs et la progression métastatique (Fig. 1 [2]), de même que d'autres membres de la famille CEACAM ; le dérèglement de l'expression de ces molécules (ACE, *biliary glycoprotein* [BGP], CNA50/90) apparaît comme un événement précoce de la tumorigenèse colique. Il existe une relation entre la production d'ACE par des lignées tumorales coliques et leur potentiel prolifératif et métastatique. L'ACE pourrait également être impliqué dans la dissémination métastatique. Enfin, il peut interférer avec l'immunité antitumorale et serait impliqué dans les phénomènes de résistance aux chimiothérapies.

Variations du taux d'antigène carcino-embryonnaire

Variations physiologiques

Des variations physiologiques sont observées entre les individus et peuvent résulter de l'influence du sexe, de l'âge ou de conditions environnementales (tabagisme). La grossesse entraîne également une augmentation des concentrations d'ACE. Les différents facteurs influençant les taux d'ACE sont résumés dans le [Tableau 1](#). Ils doivent bien évidemment être pris en compte pour l'interprétation des résultats des dosages d'ACE en pratique clinique.

Pathologies bénignes

Diverses pathologies bénignes peuvent entraîner une augmentation des taux d'ACE, mais les concentrations observées dépassent rarement 30 $\mu\text{g/L}$. Ainsi, les taux d'ACE sont modérément élevés chez 20 à 50 % des patients présentant des affections bénignes de l'intestin, du pancréas, du foie et du poumon. Les différentes pathologies en cause sont listées dans le [Tableau 2](#).

Pathologies tumorales

Des études du suivi évolutif menées chez des patients atteints d'un carcinome colorectal, du sein ou du poumon

Tableau 2 Pathologies bénignes potentiellement à l'origine d'une augmentation des taux d'ACE.

Pathologies respiratoires

Infections pulmonaires
Emphysème
Pleurésie
Tabagisme

Pathologies digestives

Pancréatites
Tumeurs bénignes du côlon (polypes bénins : 20 %)
Colite ulcéreuse
Maladie de Crohn

Pathologies hépatiques

Hépatites aiguës et chroniques
Cirrhose du foie
Éthylisme chronique

Autres pathologies

Lésions inflammatoires aiguës, chroniques
Insuffisance rénale
Endométrioses

Tableau 3 Intérêts principaux et indications du dosage de l'ACE en cancérologie.

Indications	Performances
Dépistage des tumeurs	Aucun intérêt : pas de valeur diagnostique
Pronostic et suivi thérapeutique	Intérêt majeur (cf. ci-dessous)
Cancer colorectal	Taux élevé au diagnostic = mauvais pronostic (taux de rechute à 50 %) Élévation de l'ACE pendant traitement = rechute
Cancer gastrique	Corrélation des taux avec le volume tumoral le risque de rechute la probabilité du développement de métastases

suggèrent que la concentration en ACE préopératoire est significative pour le pronostic ([Tableau 3](#)). La détermination de la concentration en ACE n'est pas recommandée comme méthode de dépistage du cancer d'une manière générale ; cependant, l'utilisation du dosage de l'ACE comme test complémentaire pour le pronostic et comme moyen de contrôle du traitement des patients atteints de cancer est largement acceptée. Le dosage de l'ACE peut présenter un intérêt pour le suivi des patients souffrant de tumeurs malignes diagnostiquées chez lesquels on peut observer des changements de concentration en ACE. Une élévation persistante de la concentration en ACE circulant après traitement est un indice fortement révélateur d'une affection métastatique et/ou résiduelle. Une élévation constante de la concentration en ACE peut être associée à l'évolution de la tumeur maligne ou à une mauvaise réponse au traitement. Une diminution de la concentration en ACE est généralement

l'indice d'un pronostic favorable et d'une bonne réponse au traitement. Les patients dont la concentration en ACE est faible avant traitement peuvent par la suite présenter une augmentation de l'ACE révélatrice de l'évolution de la maladie.

L'ACE n'est pas spécifique d'un tissu tumoral particulier, sa valeur diagnostique est donc très faible. Le dosage de l'ACE n'est donc pas recommandé pour le dépistage systématique de cancers au sein de la population. Des concentrations en ACE situées dans le domaine de référence n'excluent également pas la présence d'une affection maligne.

L'intérêt clinique du dosage de l'ACE a été mis en évidence dans le contrôle du traitement de patients souffrant de carcinome colorectal, gastrique, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas et de l'ovaire.

Cancers colorectaux

Des taux élevés d'ACE sont retrouvés chez 60 % des individus atteints de cancer du côlon ou du rectum. En effet, plus de 50 % des cancers colorectaux non métastatiques et plus de 75 à 80 % des cancers colorectaux d'emblée métastatiques présentent des taux élevés d'ACE [7]. Par ailleurs, il existe une corrélation entre le taux d'ACE et la masse tumorale, l'élévation du taux étant liée au degré d'extension locale lymphatique et à la présence de métastases à distance.

Après traitement chirurgical d'un cancer colique, la persistance d'un taux élevé signifie que le traitement a été incomplet, et qu'il peut subsister des reliquats ganglionnaires ou des métastases infracliniques. En moyenne, l'ACE s'élève quatre à huit mois avant le diagnostic clinique de récurrence ou de métastase, mais le bénéfice de la surveillance par le dosage de l'ACE n'est pas établi, les études cliniques ne montrant aucune incidence favorable sur la survie.

Cancers gastro-intestinaux et pancréatiques

L'ACE est également élevé chez 50 % des patients atteints de cancers gastriques : 12 % des cancers de l'estomac au stade M0 et 48 % des stades M1 présentent des taux d'ACE supérieurs à 5 µg/L. Le CA 72-4 peut être dosé simultanément avec l'ACE dans cette pathologie.

Dans les cancers de l'intestin, le taux d'ACE est corrélé au niveau d'extension métastatique.

Dans le cancer du pancréas, l'augmentation de l'ACE est corrélée au stade évolutif. Cependant, son dosage n'est utile qu'en seconde intention, après celui du CA 19-9 et éventuellement du CA 195.

Cancers gynécologiques

Sept pour cent des cancers mammaires présentent un taux d'ACE élevé avant traitement, mais il n'y a pas de corrélation entre le taux d'ACE et le degré d'envahissement ganglionnaire. L'ACE est plutôt utilisé en surveillance, après rémission, et dans le suivi du traitement des récurrences et des métastases. Dans ce cadre, il est habituellement associé au CA15-3. On note également une élévation des taux d'ACE dans les cancers de l'ovaire (35 %) et de l'utérus (30 %).

Autres cancers

L'ACE est également un marqueur de nombreux cancers extradiigestifs, compte tenu de sa faible spécificité. Il pourra

éventuellement être associé à un autre marqueur plus spécifique de l'organe atteint, de manière à augmenter les performances diagnostiques de ce dernier :

- cancer médullaire de la thyroïde, en association avec la calcitonine (taux élevé dans 8 % des cas) ;
- cancer bronchopulmonaire (taux élevé dans 20 % des cas) : adénocarcinomes et cancers à petites cellules (associé à la NSE). Dans les cancers bronchiques, le taux sérique d'ACE est inversement proportionnel à la survie. Ce marqueur apparaît donc comme un critère pronostique important ;
- cancers génito-urinaires.

Ainsi, les principales indications du dosage de l'ACE en cancérologie peuvent être résumées selon le [Tableau 3](#).

Formes moléculaires proches de l'analyte éventuellement présentes

L'ACE appartient à une famille très hétérogène de glycoprotéines membranaires. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de mieux caractériser et individualiser leurs différentes structures. Ainsi, six molécules dont la structure est très proche de celle de l'ACE ont pu être décrites :

- le groupe des *non-specific cross reacting antigens* (NCA) : NCA 55, NCA 95, NCA 160, qui sont largement exprimés par les tissus épithéliaux de différents organes, ainsi que par les granulocytes et les monocytes ;
- l'ACE-M, variant membranaire de l'ACE de moindre masse moléculaire ;
- la *biliary glycoprotein I* (BGPI), constituant normal de la bile ;
- la *pregnancy specific glycoprotein* (PSG), produite par le placenta au niveau du syncytiotrophoblaste, en particulier lors du premier trimestre de grossesse. Une expression du gène a également été notée dans d'autres organes, mais à de faibles niveaux.

Ces protéines, structurellement très proches de l'ACE, présentent une distribution fœtale, tissulaire, physiologique ou oncologique, similaire à cette molécule. De plus, plusieurs caractéristiques sont partagées par ces différentes molécules et l'ACE : tout d'abord, elles possèdent toutes un domaine N-terminal de type *IgV-like*, qui ne comporte pas de pont disulfure intrachaine, celui-ci étant remplacé par un pont salin. De plus, ces molécules sont hautement glycosylées, sur des résidus asparagine, le plus souvent, voire exclusivement, par des chaînes glucidiques multi-antennaires (ramifiées). Ces résidus glucidiques peuvent représenter plus de 50 % de la masse de la molécule.

Données immuno-analytiques utiles pour le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire

Phase préanalytique

Conditions de prélèvement

La programmation et la périodicité du prélèvement sont fonction de la pathologie, de la thérapeutique et

de l'objectif du dosage (suivi, réponse au traitement, pronostic...). Différents renseignements devront être mentionnés sur la prescription, notamment la pathologie suivie, les modalités et la date d'un éventuel traitement, chirurgical ou non.

Aucune variation nycthémérale du taux d'ACE n'a été décrite. De ce fait, l'heure de prélèvement importe peu. De même, le jeûne ne semble pas indispensable pour ce dosage (on évitera tout de même de prélever le malade après un repas, afin de se prémunir de tout sérum fortement lactescent).

Prélèvement

Le sang veineux est recueilli par ponction au niveau du pli du coude. Les précautions standards relatives à la protection contre les risques biologiques devront être observées au cours de l'obtention et de la manipulation des échantillons biologiques.

Selon le kit de dosage utilisé, différents prélèvements peuvent être analysés ; il conviendra donc de se référer aux instructions du fabricant du réactif et du matériel de prélèvement. La plupart des trousseaux réactifs permettent l'analyse de sérum, celui-ci pouvant être recueilli sur tube standard ou contenant un gel séparateur. Certains kits permettent également de réaliser le dosage sur du plasma, celui-ci pouvant être prélevé sur héparinate de sodium, sur EDTA tripotassique, voire même sur citrate de sodium. Toutefois, en cas de dosage d'ACE sur du plasma recueilli sur héparinate de sodium ou de lithium, ou encore sur citrate de sodium, les résultats obtenus devront être éventuellement corrigés selon un facteur communiqué par le fabricant du réactif, pour être transposable aux valeurs obtenues sur du sérum. Ainsi, lors de l'évaluation de séries d'échantillons ou pour le suivi d'un même patient, il est recommandé d'utiliser le même type d'échantillons pendant toute l'étude.

L'ACE peut également être dosé dans divers liquides biologiques : épanchements pleuraux, liquides d'aspiration et de lavage bronchoalvéolaire, dans le cadre des cancers bronchopulmonaires et des mésothéliomes, urines pour les cancers de vessie (le dosage de l'ACE pouvant être associé à celui de l'antigène tissulaire polypeptidique (ou *tissue polypeptide antigen* [TPA]) dans cette indication).

Conditions de transport et de centrifugation

Les instructions du fabricant de trousseaux réactifs et de dispositifs de prélèvement, relatives au traitement des échantillons avant analyse, devront être impérativement respectées.

Après prélèvement d'un sérum, il convient de s'assurer que le caillot s'est complètement formé et rétracté dans le tube avant de le centrifuger. Certains échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous traitement anticoagulant ou thrombolytique, pourront présenter des temps de coagulation élevés. Si l'échantillon est centrifugé avant la formation complète du caillot, la présence de fibrine peut entraîner des résultats erronés.

Les échantillons peuvent être conservés au maximum pendant sept jours entre 2 et 8 °C avant d'être analysés. Si le dosage est effectué plus de 24 heures après le prélèvement, le sérum ou le plasma devra être centrifugé et

décanté. Si le dosage est effectué plus de sept jours après le prélèvement, les échantillons devront être conservés congelés à une température inférieure ou égale à -20 °C pendant six mois au maximum. Il est recommandé d'éviter des congélations/décongélations répétées. Tous les échantillons décongelés doivent être homogénéisés avec soin au Vortex®. Pour la stabilité du sérum prélevé sur tubes à gel séparateur et du plasma, il est recommandé de se conformer aux indications données par le fabricant des réactifs et des dispositifs de prélèvement.

Avant analyse, il convient de s'assurer que les différents échantillons à analyser (échantillons patients, calibrants et contrôles) sont bien revenus à température ambiante (20–25 °C). Les échantillons de patients doivent être manipulés avec précaution, afin d'éviter toute contamination croisée. Enfin, compte tenu des risques d'évaporation et de concentration des échantillons, il est recommandé d'effectuer les dosages dans les deux heures suivant le chargement des tubes sur l'analyseur.

Tous les échantillons, contenant des traces de fibrine, des globules rouges, un précipité ou toutes autres particules en suspension, doivent être de nouveau centrifugés avant l'analyse. Les échantillons troubles doivent également être centrifugés avant analyse. Il est également recommandé de ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés, présentant une contamination microbienne évidente ou inactivés par la chaleur. De même, certains fabricants de tests invitent à ne pas utiliser d'échantillons ou de solutions de contrôles stabilisés par de l'azide de sodium.

Données spécifiques concernant l'immunodosage

Les valeurs obtenues par différentes méthodes d'analyse ne sont absolument pas interchangeables. Ainsi, la concentration en ACE d'un même échantillon, déterminée à l'aide de différentes méthodes de dosage, pourra varier à cause des différences dans les procédés de dosage et de la spécificité des réactifs. De ce fait, le compte rendu du laboratoire devra toujours préciser la méthode de dosage et le nom du kit utilisés. Les taux d'ACE d'un patient obtenus à partir de différentes méthodes ne peuvent donc pas être comparés. En cas de changement de méthode au cours du suivi thérapeutique, les taux d'ACE doivent être confirmés pendant une période transitoire en effectuant des dosages en parallèle par les deux méthodes.

Techniques immunologiques

Les premiers dosages d'ACE reposaient sur des techniques radio-immunologiques (RIA) [8]. Ces méthodes de dosage de l'ACE nécessitaient l'extraction préalable de l'antigène, ce qui rendait la détermination relativement peu précise. Par ailleurs, ces dosages utilisaient des anticorps polyclonaux, à l'origine de nombreuses réactions croisées avec les membres de la famille ACE, en particulier les NCA. De ce fait, les différences de résultats obtenus pour un même échantillon avec deux techniques différentes pouvaient être considérables.

Actuellement, de très nombreux anticorps monoclonaux, qui ne reconnaissent pas les NCA, permettent le dosage de l'ACE dans le sérum par diverses techniques immunométriques de type sandwich [9]. Les nombreux dosages existant actuellement utilisent un marqueur radioactif,

fluorescent ou enzymatique avec révélation par colorimétrie, par chimiluminescence ou par fluorescence. Les variants de glycosylation du marqueur, la multiplicité des anticorps monoclonaux, des sites antigéniques reconnus, des techniques de dosage et des étalonnages, conduisent ainsi à une importante dispersion intertechnique des résultats.

Expression des résultats

Les résultats peuvent être exprimés au choix en ng/mL ou en $\mu\text{g/L}$: 1 ng/mL d'ACE correspond à 16,9 mUI/mL. La valeur de référence seuil, couramment admise pour les techniques immunométriques en phase solide (techniques les plus fréquemment utilisées), est de 5 à 5,5 $\mu\text{g/L}$.

Épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux

Les épitopes de l'ACE ont été caractérisés et les anticorps monoclonaux disponibles reconnaissent six groupes d'épitopes [9,10]. Les anticorps utilisés par les kits de dosage reconnaissent principalement la partie polypeptidique et se fixent habituellement sur deux groupes distincts (par exemple, le groupe 2 et le groupe 5).

Les anticorps induits pour détecter l'ACE peuvent réagir avec diverses protéines présentes dans les tissus normaux, telles que : les antigènes NCA1 et NCA2, les *tumor-extracted related antigens* (TEX), la glycoprotéine biliaire 1 (GPB-1), le *normal fecal antigen* 1 et 2 (FAN1 et FAN2), présents dans le liquide de lavage d'un côlon sain, et l'antigène méconium (*meconial antigen* ou MA). La plupart des anticorps utilisés dans les tests de détermination de l'ACE réagissent avec l'antigène méconium et dans une moindre mesure avec le NCA1 (réaction croisée < 1 %) [11].

Problèmes analytiques éventuels

Limites d'utilisation — Interférences

Les kits de dosage utilisant des anticorps monoclonaux de souris sont soumis aux interférences éventuelles d'anticorps humains anti-souris (*human anti-mouse antibody* ou HAMA). Ces HAMA peuvent être présents dans les sérums de patients ayant auparavant reçu des injections d'anticorps monoclonaux de souris, dans un but diagnostique et/ou thérapeutique. De telles interférences peuvent donner des résultats erronés, c'est-à-dire faussement élevés ou abaissés. Certains kits de dosage contiennent un constituant réduisant l'effet des HAMA sur les dosages. De même, des anticorps hétérophiles présents dans le sérum du patient peuvent réagir avec les immunoglobulines utilisées pour le dosage et interférer avec la formation du complexe antigène-anticorps. Ces anticorps hétérophiles sont retrouvés dans le sérum de sujets exposés de façon routinière aux animaux ou à des produits contenant du sérum d'animaux. Des résultats perturbés ou incohérents avec le tableau clinique doivent donc inciter le biologiste à récolter toutes les informations cliniques ou diagnostiques pouvant faire suspecter la présence de tels anticorps.

Les autoanticorps, notamment le facteur rhumatoïde, peuvent également influencer la formation du complexe antigène-anticorps et ainsi perturber le dosage. La plupart des fabricants étudient les interférences liées au facteur rhumatoïde et précisent une concentration seuil en dessous de laquelle il n'a pas été observé d'interférences (parfois

jusqu'à 1000 ou 1500 UI/mL). Il est donc conseillé de consulter la documentation du fournisseur de la trousse réactif utilisée.

La plupart des techniques actuelles minimisent l'influence de l'effet crochet par des lavages répétés entre chaque étape. Le seuil de concentration, en deçà duquel il n'a pas été observé d'effet crochet, varie selon les fournisseurs entre des concentrations de 60 à 200 000 ng/mL.

Divers médicaments peuvent également influencer les performances du dosage. Les fabricants réalisent généralement des essais *in vitro* portant sur les médicaments les plus fréquemment administrés. L'utilisateur est donc invité à consulter la documentation du fabricant pour connaître la liste des substances testées, avec les concentrations employées.

Certaines substances et anticorps peuvent également interagir avec les systèmes utilisés pour la détection du complexe antigène-anticorps. L'administration de fortes doses de biotine (> 5 mg/j) peut inhiber la formation du complexe biotine-streptavidine (il est dans ce cas recommandé d'effectuer le prélèvement de l'échantillon au moins huit heures après la dernière administration). Des anticorps anti-streptavidine et anti-ruthénium à très fortes concentrations peuvent également générer des interférences, bien que des protections existent dans les kits actuels.

Indépendamment du kit employé et des interférences potentielles auxquelles il est soumis, les résultats du dosage d'ACE doivent toujours être confrontés aux autres éléments du dossier du patient, à savoir : l'anamnèse, l'examen clinique et les résultats des autres examens complémentaires, notamment l'imagerie et l'endoscopie.

Interférences visibles

Les fabricants s'accordent pour déconseiller l'analyse d'un échantillon très fortement hémolysé ou lactescent.

L'hémolyse, la lactescence et la bilirubine peuvent interférer sur les résultats des dosages. Il est donc recommandé de vérifier les limites communiquées par le fabricant du kit, en deçà desquelles cette interférence est considérée comme négligeable et n'influence pas le résultat (le critère d'acceptabilité le plus souvent retenu correspond à un recouvrement de $\pm 10\%$ par rapport à la valeur initiale). Il est recommandé de ne pas prélever des patients après un repas, de manière à réduire le risque d'échantillon très lactescent.

Molécule de référence utilisée pour la calibration

Le calibrant de référence utilisé pour le dosage de l'ACE est la première préparation internationale de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) : 1st IRP WHO Reference Standard 73/601 [12]. Cette préparation de référence a été développée par le WHO Expert Committee on Biological Standardisation en 1976. Chaque ampoule contient 100 UI d'ACE sous forme lyophilisée. Pour de plus d'informations, le lecteur pourra consulter le site Internet des standards biologiques de l'OMS à l'adresse suivante : <http://www.who.int/biologicals/en/>.

Cotation et informations diverses

Il importe de noter :

- code NABM : 7327 ;
- cotation = B55.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tout particulièrement Mme le Docteur Brigitte Dousset, praticien hospitalier au laboratoire de biochimie spécialisée de l'hôpital central du CHU de Nancy, pour sa relecture attentive du manuscrit.

Références

- [1] Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121: 439–62.
- [2] Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 2006;6:41.
- [3] Krupey J, Gold P, Freedman SO. Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1968;128:387–98.
- [4] Krupey J, Wilson T, Freedman SO, Gold P. The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochimistry* 1972;9:617–22.
- [5] Harvey SR, Chuand TM. Demonstration of two molecular variants of carcinoembryonic antigen by concanavalin A sepharose affinity chromatography. *Cancer Res* 1975;35:3001–8.
- [6] Thompson JA. Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members. *Tumour Biol* 1995;16:10–6.
- [7] Ballesta AM, Molina R, Filella X, Jo J, Gimenez N. Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour Biol* 1995;16:32–41.
- [8] Thomson DM, Krupey J, Freedman SO, Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;64: 161–7.
- [9] Hammarstrom S, Shively JE, Paxton RJ, Beatty BG, Larsson A, Ghosh R. Antigenic sites in carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1989;49:4852–8.
- [10] Bormer OP, Thrane-Steen K. Epitope group specificity of six immunoassays for carcinoembryonic antigen. *Tumour Biol* 1991;12:9–15.
- [11] Kuroki M, Haruno M, Arakawa F, Wakisaka M, Matsuoka Y. Reaction profiles of seven enzyme immunoassay kits for carcinoembryonic antigen (CEA) analyzed with purified preparations of CEA and related normal antigens. *Clin Biochem* 1992;25:29–35.
- [12] Laurence DJ, Turberville C, Anderson SG, Neville AM. First British standard for carcinoembryonic antigen (CEA). *Br J Cancer* 1975;32:295–9.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE

Caractéristiques immuno-analytiques de la copeptine



Immunoanalytical characteristics of copeptin

C. Desbene*, O. Gaillard

Laboratoire de biochimie, pôle de biologie pathologie, centre hospitalier Le Mans, 194, avenue Rubillard, 72037 Le Mans cedex 09, France

Reçu le 3 septembre 2013 ; accepté le 5 septembre 2013

KEYWORDS

Copeptin;
Hypothalamo-hypophyseal system;
Arginine vasopressin;
Cardiovascular diseases;
Shock syndrome;
Intensive care

MOTS CLÉS

Copeptine ;
Axe hypothalamo-hypophysaire ;
Arginine vasopressine ;
Pathologies cardiovasculaires ;
État de choc ;
Soins intensifs

Summary Besides structural and physiological data of copeptin, this paper points out the optimal conditions for sampling, assays and interpretation of results.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé Après les caractéristiques structurales et physiologiques de la copeptine, les données pré, per et post analytiques de son dosage sont abordées pour l'interprétation des résultats.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Analyte intact

Structure de l'analyte

La copeptine, également dénommée glycopeptide associé à l'arginine vasopressine (AVP), est un peptide de 39 acides

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : cdesbene@ch-lemans.fr (C. Desbene),
ogaillard@ch-lemans.fr (O. Gaillard).

aminés (aa), dont la masse moléculaire avoisine 5 KDa. Ce peptide possède un site de N-glycosylation et contient un segment central riche en résidus leucine. Il a été isolé pour la première fois en 1972 par Holwerda dans des posthypophyses de porcs [1].

La structure primaire de la copeptine est la suivante : ASDRSNATQLDGPAGALLRLVQLAGAPEPFEPAPQDAY.

La copeptine, comme l'AVP, provient du clivage protéolytique d'une protéine précurseur, la préprovasopressine (proAVP), constituée de 164 aa et codée par le gène AVP, situé sur le chromosome 20, en position 20p13. Cette protéine précurseur comporte un peptide signal, l'AVP, la neurophysine II et la copeptine (Fig. 1) [2]. Ainsi, la copeptine constitue la partie C-terminale de la provasopressine (CT-proAVP). De ce fait, la copeptine et l'AVP sont cosécétrées par la posthypophyse, dans des proportions stœchiométriques.

La copeptine présenterait une demi-vie in vivo relative-ment courte, de l'ordre de 25 minutes, tout comme l'AVP. Mais, contrairement à cette dernière, elle est relativement stable in vitro, une fois le prélèvement sanguin réalisé.

Après synthèse de la proAVP dans les noyaux magnocellulaires de l'hypothalamus, la protéine précurseur subit l'action de 4 enzymes pour adopter sa configuration biologiquement active (Fig. 2). Après le clivage du peptide signal, la proAVP se replie, en plaçant la séquence peptidique correspondant à l'AVP dans un site de liaison, situé dans la séquence de la neurophysine II. Ce repliement permet un compactage de la protéine, indispensable à son intégration dans les vésicules neurosécétrées et protège l'AVP de la



Figure 1 Représentation schématique de la protéine précurseur de l'arginine vasopressine. Cette protéine précurseur est composée d'un peptide signal (gris), de l'arginine vasopressine (AVP, rouge), de la neurophysine II (orange) et de la copeptine (CT-proAVP, mauve). Les acides aminés correspondant aux limites respectives des différents domaines sont également indiqués [3].

protéolyse. Suivent ensuite la création de 7 ponts disulfures dans le domaine de la neurophysine II et d'un pont dans celui de l'AVP, ainsi que la glycosylation de la copeptine. La proAVP est ensuite transférée dans les vésicules neurosécétrées, où elle subira différents clivages, au cours de son transport axonal, de l'hypothalamus vers la post-hypophyse : un premier clivage libère d'abord l'AVP, puis la copeptine est séparée de la neurophysine II. Ces différents clivages sont achevés lorsque les vésicules arrivent à la neurohypophyse.

Activités biologiques et concentrations physiologiques de la copeptine

Les actions physiologiques de la copeptine n'ont été décrites que récemment. Initialement considérée comme un facteur entraînant la libération de prolactine, la copeptine apparaît actuellement comme un élément clé pour la conformation

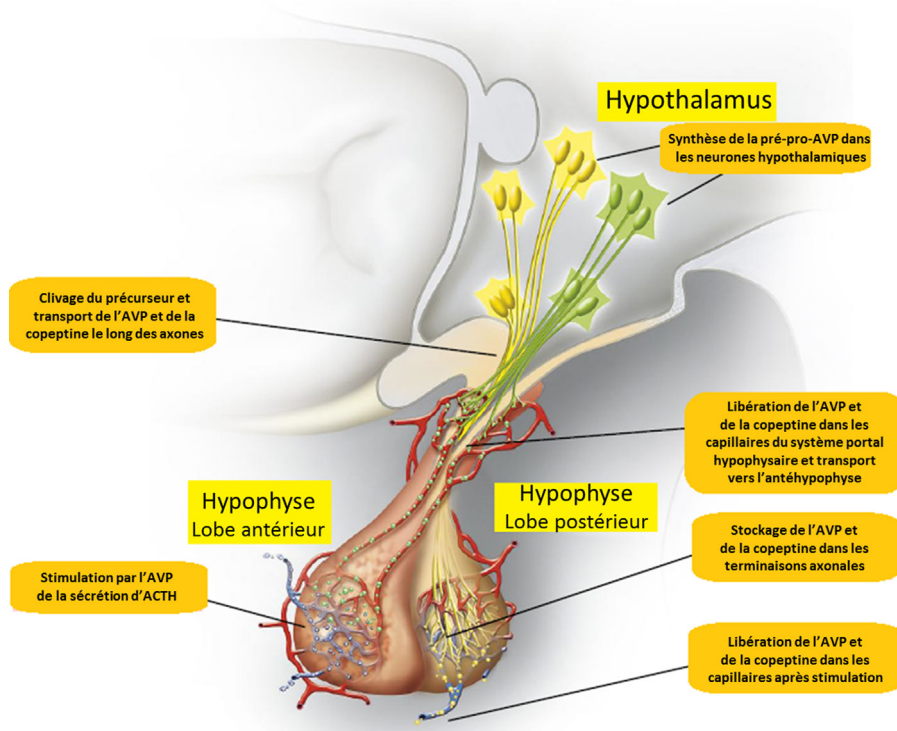


Figure 2 Sécrétion post-hypophysaire de l'arginine vasopressine et de la copeptine. Les deux protéines sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, qui subit un processus de maturation au sein des granules neurosécétrées, au cours de leur progression le long de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La copeptine et l'AVP sont ensuite stockées au niveau des axones des neurones neurosécétrées. Après stimulation, les protéines sont libérées dans les capillaires avoisinants [4].

correcte de la proAVP, permettant ainsi sa maturation protéolytique ultérieure [5]. La copeptine interagit probablement avec le système calnexine-calréticuline, qui régule la conformation correcte des protéines et interagit avec les protéines glycosylées. Ainsi, on ne retrouve pas de motif copeptine dans le précurseur de l'ocytocine, une autre hormone post-hypophysaire ; le précurseur de l'ocytocine semble en effet beaucoup plus stable que celui de l'AVP. L'absence de copeptine pourrait enfin être impliquée dans la pathogenèse du diabète insipide neurogénique.

Les concentrations plasmatiques en copeptine, mesurées sur un échantillon des 359 sujets sains, varient entre 1,0 et 13,8 pmol/L (valeur médiane : 4,2 pmol/L ; IC_{95%} : 1,7–11,25 pmol/L). Les concentrations médianes en copeptine sont significativement plus élevées chez les hommes que chez les femmes (5,2 vs 3,7 pmol/L, $p < 0,0001$). Toutefois, les plages de valeurs observées sont strictement superposables entre ces deux groupes. Enfin, la copeptine plasmatique semble ne pas varier en fonction de l'âge [6]. Il ne semble pas non plus exister de variations circadiennes du taux de copeptine chez l'adulte en bonne santé, quoique les études disponibles aient été réalisées sur un petit nombre d'individus [7]. L'exercice physique peut entraîner une augmentation modérée du taux de copeptine chez certains individus. Chez les sujets sains, la concentration en copeptine est influencée par différents facteurs physiologiques (de même que celles de l'AVP). En effet, elle augmente en période de jeûne et diminue rapidement après une charge hydrique [6]. Comme l'AVP, la concentration en copeptine est influencée par le statut hydrique et l'osmolarité plasmatique du sujet. Ainsi, chez le volontaire sain, une diète hydrique ou l'administration de sérum salé hypertonique augmente la concentration en copeptine. À l'inverse, la perfusion de sérum hypotonique entraîne une diminution de son taux [6].

Variations pathologiques de la copeptine

L'insuffisance rénale entraîne une augmentation du taux sanguin de copeptine, probablement liée à une diminution de la clairance rénale de cette protéine. Ainsi, il existe une forte corrélation entre le taux de copeptine et la diminution du débit de filtration glomérulaire, en particulier chez les individus de sexe masculin. De plus, l'administration de corticoïdes inhibe la sécrétion de copeptine.

Intérêt du dosage de la copeptine en pathologie

Comme nous l'avons mentionné antérieurement, la copeptine est cosécrétée avec l'AVP par les neurones hypothalamiques au niveau de la posthypophyse. La copeptine représente donc un témoin fidèle de la sécrétion d'AVP et son dosage apparaît beaucoup plus aisé que celui de l'AVP, qui présente une durée de vie réduite et une instabilité importante. La sécrétion d'AVP (et, par voie de conséquence, de copeptine) constitue une réponse de l'organisme à divers stress, parmi lesquels on peut notamment citer : l'hypotension artérielle, l'hypoxie, l'hypoglycémie, l'hyperosmolarité, l'acidose et les états infectieux. L'AVP exerce 3 actions principales : une vasoconstriction artériolaire, par l'intermédiaire de son récepteur V1, un effet

antidiurétique sur le rein, par son récepteur V2, et la libération d'ACTH par l'antéhypophyse, laquelle stimule la sécrétion de cortisol (ce dernier effet implique un autre récepteur à l'AVP encore mal caractérisé).

Troubles hydroélectrolytiques

En raison de sa co-sécrétion avec l'ADH, la copeptine apparaît comme un marqueur biologique de choix pour l'exploration des déséquilibres hydrosodés [4]. Elle semble notamment contributive dans le diagnostic différentiel entre un syndrome de sécrétion inappropriée d'ADH (SIADH) et une déplétion en sodium, devant la découverte d'une hyponatrémie (un SIADH s'accompagnant d'une élévation de la copeptine). À l'inverse, la copeptine permettrait également l'exploration étiologique du diabète insipide (caractérisé par des concentrations basses et non stimulables de copeptine) et, notamment, de porter le diagnostic différentiel avec un syndrome polyuro-polydipsique. Cependant, les performances du test pourraient être limitées par le recouvrement partiel des valeurs de copeptine entre ces divers groupes de patients et l'existence d'autres pathologies associées, provoquant une augmentation du taux de copeptine.

État de choc, détresses vitales

Le taux sanguin de copeptine augmente dans diverses situations de stress, notamment en cas de choc septique ou hémorragique, de syndrome de réponse inflammatoire systémique ou de chirurgie lourde [8]. Les taux de copeptine se normalisent parallèlement à l'amélioration de l'état hémodynamique. Dans les états infectieux sévères, les concentrations de copeptine sont corrélées à la sévérité du sepsis et à la survie globale du patient.

Insuffisance cardiaque et infarctus du myocarde

Au cours de l'infarctus du myocarde (IDM), la copeptine s'élève très précocement, alors que la troponine demeure encore indétectable (0 à 4 heures après le début des symptômes) [9]. Un taux normal de copeptine et de troponine au moment de l'admission aux urgences permet ainsi d'exclure le diagnostic d'IDM avec une valeur prédictive négative de plus de 99 %. Le dosage de la copeptine peut également être couplé au dosage ultrasensible de la troponine, ce qui augmente les performances du diagnostic [10]. Au décours d'un épisode d'IDM, une augmentation de la copeptine est associée avec une surmortalité et un risque élevé d'insuffisance cardiaque dans un court délai (2 mois). Dans l'insuffisance cardiaque chronique, un taux élevé de copeptine constitue un indicateur de mauvais pronostic à moyen et long terme, notamment en termes de mortalité et d'hospitalisation pour décompensation, ce pouvoir prédictif peut être augmenté par le dosage concomitant du peptide natriurétique cérébral (*brain natriuretic peptide* ou BNP). De plus, la copeptine peut être associée à la natrémie et aux peptides natriurétiques dans l'insuffisance cardiaque aiguë pour prédire une surmortalité à 90 jours, une probabilité élevée d'hospitalisation ultérieure. En particulier, l'association d'une copeptine élevée à une hyponatrémie semble de pronostic particulièrement défavorable [11].

Pathologies respiratoires

Les infections des voies respiratoires inférieures entraînent une augmentation des taux de copeptine, cette augmentation étant corrélée à la sévérité de l'infection [12]. Dans les pneumopathies aiguës communautaires de l'adulte, la valeur de la copeptine à l'admission aux urgences est corrélée à une sévérité accrue de l'infection et à un pronostic défavorable; les taux de copeptine semblent, par ailleurs, plus importants chez les patients ayant des hémocultures positives. Dans les épisodes de décompensation de broncho-pneumopathies chroniques obstructives, la copeptine apparaît également comme un marqueur indépendant de mauvais pronostic. Enfin, la copeptine constitue un marqueur de sepsis et de mauvais pronostic dans les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.

Pathologies neurologiques

Dans les accidents vasculaires cérébraux ischémiques, une augmentation du taux de copeptine à l'admission est associée à une gravité accrue, à un pronostic fonctionnel défavorable et à une surmortalité élevée à court et long terme [13]. De même, une élévation de la copeptine au décours d'un accident ischémique transitoire est associée à un risque élevé de récurrence de l'accident sous 90 jours. La copeptine posséderait également une valeur pronostique et de gravité dans les hémorragies intracérébrales et sous-arachnoïdiennes. Elle aurait également une valeur de pronostic péjoratif dans les traumatismes crâniens, de l'adulte comme de l'enfant.

Autres applications et valeur pronostique de la copeptine

La copeptine présente également une valeur pronostique dans de nombreuses affections chroniques. C'est notamment le cas du diabète de type 2, où son augmentation est associée à une surmortalité globale, notamment d'origine cardiovasculaire [14]. De plus, chez les sujets atteints de néphropathie diabétique (diabète de type 2 avec microalbuminurie), la copeptine constitue un marqueur de risque élevé de détérioration rapide de la fonction rénale et d'évolution à court terme vers l'insuffisance rénale. La copeptine posséderait également une valeur pronostique et de gravité dans la cirrhose hépatique. En cas de pancréatite aiguë, on constate également une augmentation de la copeptine et celle-ci est plus importante dans les formes sévères que dans les formes modérées. Dans l'insuffisance rénale chronique, la copeptine peut constituer un facteur de risque de complications cardiovasculaires. La copeptine pourrait également présenter un intérêt dans le «tri» des sujets âgés se présentant aux urgences pour des symptômes non spécifiques (et/ou mal définis) et permettrait ainsi de guider la prise en charge de tels patients. En effet, l'élévation des taux de copeptine chez ces patients au moment de l'admission constitue un indicateur prédictif de pronostic défavorable et de gravité, qui appelle une prise en charge plus agressive d'emblée.

Formes moléculaires proches de l'analyte éventuellement présentes

La copeptine ne présente pas d'analogues de séquence connus (une recherche de protéines de structure primaire identique ou voisine dans les bases de données s'avère infructueuse). Par ailleurs, les fabricants des différents kits considèrent le dosage de la copeptine comme hautement spécifique et ne rapportent pas de protéines pouvant être reconnues par les anticorps (Ac) utilisés pour sa détection.

Il n'existe pas de données concernant une éventuelle oligomérisation de la copeptine ou sa liaison avec d'autres partenaires protéiques.

Enfin, peu de données sont disponibles dans la littérature sur le catabolisme de la copeptine ou de ses éventuels fragments. Le rein semble impliqué dans la dégradation de la copeptine, puisque l'insuffisance rénale majore ses taux circulants.

Données immuno-analytiques utiles pour le dosage de la copeptine

Comme nous l'avons vu plus haut, la copeptine et l'AVP sont cosécrétées par la posthypophyse, dans des proportions égales. Le dosage de la copeptine peut ainsi se substituer à celui de l'AVP, celui-ci étant particulièrement délicat (liaison de l'AVP aux plaquettes sanguines, analyte instable et de demi-vie très courte – 24 minutes –, mesure par compétition...). De fait, on préfère mesurer une molécule stable in vitro, dérivée du précurseur de l'AVP, telle que la copeptine, plutôt que l'AVP elle-même.

Phase pré-analytique

Conditions de prélèvement

Comme mentionné plus haut, le statut hydrique et l'osmolarité plasmatique influencent les concentrations sanguines en copeptine [6]. De fait, il est nécessaire d'éviter une diète hydrique prolongée ou une prise d'eau importante avant le prélèvement (sauf, bien évidemment, dans le cadre de l'exploration dynamique d'un trouble de la sécrétion d'AVP).

Prélèvement

Le sang veineux est recueilli par ponction au niveau du pli du coude. Les précautions relatives à la protection contre les risques biologiques devront être observées au cours de l'obtention et de la manipulation des échantillons biologiques.

Le dosage de la copeptine peut être réalisé sur du plasma (EDTA, héparine) ou sur du sérum.

Il convient de respecter les indications communiquées par les fabricants du matériel de prélèvement et du kit de dosage.

Aucune précaution pré-analytique particulière n'est recommandée pour le dosage de la copeptine; l'ajout d'antiprotéases au prélèvement n'est notamment pas nécessaire.

Traitement des échantillons

Les conditions de centrifugation doivent impérativement suivre les instructions du fabricant de matériel de prélèvement.

La copeptine est stable dans le sérum ou le plasma pendant 7 jours à température ambiante et 2 semaines à 4 °C (recouvrement > 80 %, cf. Fig. 3). Si le dosage doit être réalisé dans les 24 heures suivant la prise de sang, le fabricant du kit recommande une conservation des échantillons à température ambiante ou entre 2–8 °C. Sinon, il est conseillé de les aliquoter et de les congeler à –20 °C. Il est possible de congeler et de décongeler les échantillons trois fois.

Les échantillons icteriques, hémolytiques ou lactescents, les échantillons troubles ou contenant des traces de fibrine peuvent donner des résultats imprécis. Il convient d'interpréter avec prudence les résultats de tels échantillons, voire de demander un prélèvement de contrôle.

Données spécifiques concernant l'immunodosage

Épitopes reconnus par les anticorps

Les Ac utilisés pour le dosage de la copeptine sont dirigés contre la séquence 132–164 de la proAVP, ce qui correspond à la partie C-terminale de ce précurseur. Le premier Ac est dirigé contre les aa 132–147 de la proAVP (séquence ATQLDGPAGALLRLV). Le second Ac reconnaît les aa 149–164 (séquence LAGAPEPFEPQPDAY).

Techniques immunologiques

Le dosage immunologique de la copeptine actuellement disponible repose sur une technique de type sandwich. La détection du complexe antigène (Ag)/Ac peut être réalisée selon différentes modalités, suivant l'appareillage utilisé (Fig. 4) :

- technique immunoluminescente : le premier Ac polyclonal permet la capture de l'Ag et se trouve lié à la phase solide (tubes de polystyrène). Le second Ac polyclonal constitue le traceur et est marqué à l'ester d'acridinium pour générer la réaction de chimiluminescence ;

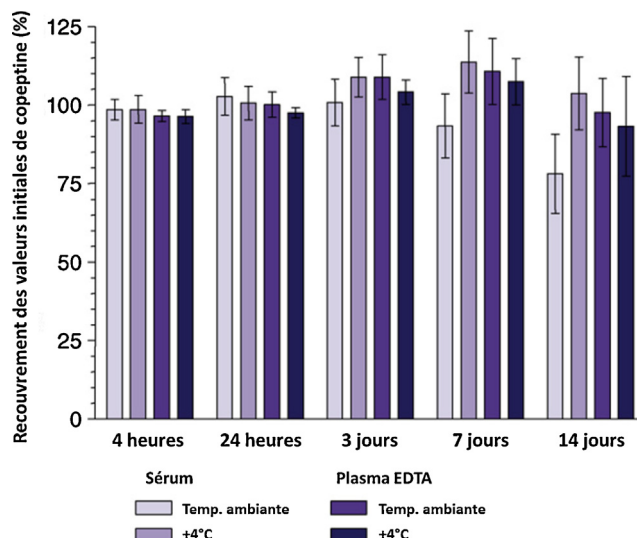
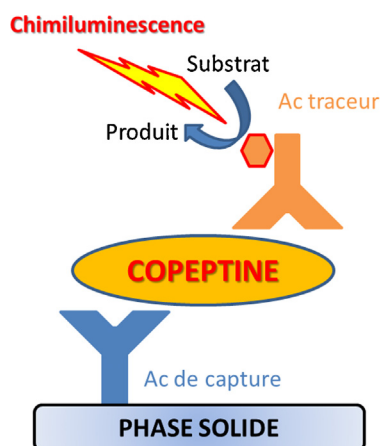


Figure 3 Stabilité ex vivo de la copeptine selon la nature du prélèvement et la température de conservation. Recouvrement des valeurs initiales pour des échantillons de sérum et de plasma EDTA conservés à température ambiante et à 4 °C pendant 4 heures, 24 heures, 3, 7 et 14 jours ($n = 5$ échantillons par condition). Les concentrations en copeptine des échantillons variaient de 3 à 200 pmol/L. Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type du pourcentage de la valeur initialement mesurée (rapportée à 100 %) [3].

- technique TRACE™ (*Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*) : cette technique, disponible sur les automates Kryptor® (ThermoFisher), repose sur un transfert d'énergie non radiatif entre un donneur (structure cryptate renfermant un ion europium) et un accepteur (protéine d'algue modifiée absorbant la lumière : XL 665), ces derniers étant chacun liés à un Ac. En présence de copeptine, la formation d'un complexe immun Ag/Ac provoque leur rapprochement et permet le transfert d'énergie : le signal de fluorescence obtenu est ainsi proportionnel à la concentration de copeptine dans l'échantillon ;

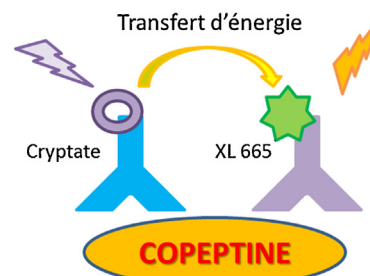


Figure 4 Techniques immuno-analytiques utilisées pour la détection de la copeptine [3]. À gauche : technique immunoluminescente sandwich. À droite : technologie TRACE™.

- technique immunoenzymatique Elisa (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en microplaques.

Expression des résultats

Les résultats du dosage de la copeptine sont habituellement exprimés en pmol/L. La copeptine sanguine est détectable chez plus de 97 % des sujets sains, quelle que soit leur osmolarité plasmatique (contrairement à l'AVP, qui est indétectable chez certains sujets présentant une osmolarité moyenne ou basse).

Performances des techniques de dosage

Les différents kits disponibles sur le marché utilisent un volume d'échantillon de l'ordre de 50 µL (sans prendre en compte le volume mort éventuel). La technique TRACE™ permet d'obtenir des résultats en 19 minutes, contre 3 heures pour la technique immunoluminescente. De par leur difficile automatisation, les techniques Elisa en microplaques sont difficilement adaptables au contexte d'urgence et semblent réservées à la recherche clinique. Le domaine de mesure varie de 4,8 à 500 pmol/L (et jusqu'à 1200 pmol/L après dilution automatique) pour la technique TRACE™. Le seuil de sensibilité analytique est compris entre 1,7 pmol/L pour la technique immunoluminescente et 4,8 pmol/L pour la technique TRACE™. Le coefficient de variation interlaboratoire demeure inférieur à 20 % pour les différents kits de dosage, quelle que soit la concentration testée. Les différentes caractéristiques du dosage de la copeptine sont résumées dans les [Tableaux 1 et 2](#).

Problèmes analytiques éventuels

Les réactifs utilisés pour le dosage contiennent des immunoglobulines animales d'espèces homologues à celles ayant servi à la production des Ac. Ceux-ci permettent de complexer les Ac hétérophiles (ou HAMA: *Human Anti-Mouse Antibodies*) éventuellement présents dans le sang des patients, et ainsi de réduire le risque de perturbations liées à la présence de ces Ac.

Aucun effet crochet, survenant pour de très hautes doses d'Ag, n'a pu être observé jusqu'à des concentrations de copeptine de l'ordre de 2000 pmol/L.

Tableau 1 Performances du dosage de la copeptine par la technologie TRACE™ (*Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*).

Caractéristique	Valeur
Seuil de détection	4,8 pmol/L
Sensibilité fonctionnelle du dosage (précision inter-dosage d'un CV de 20 %)	12 pmol/L
Limite de quantification	14,1 pmol/L
Linéarité (taux de récupération sur des dilutions d'échantillons fortement concentrés)	80 % à 120 %
Effet crochet	2000 pmol/L

Évaluation des caractéristiques du dosage de la copeptine par la technologie TRACE™ selon les recommandations EP17-A (évaluation de la performance de précision des dispositifs de chimie clinique) du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Tableau 2 Précision/Reproductibilité intra- et inter-essai du dosage de la copeptine par le coffret utilisant la technologie TRACE™ (*Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*).

Concentration en copeptine (pmol/L)	CV intra-essai (%)	CV inter-essai (%)
12–20	< 17	< 15
20–50	< 12	< 13
> 50	< 6	< 8

Les CV intra- et inter-essais du dosage de la copeptine sont indiqués pour différents niveaux de concentration en analyte testés.

Tableau 3 Interférences de diverses substances sur le dosage de la copeptine par la technologie TRACE™ (*Time-Resolved Amplified Cryptate Emission*).

Substance interférente	Seuil de concentration testée (absence d'interférence)
Hémoglobine	500 mg/L
Bilirubine	50 mg/L
Triglycérides	5 g/L
Albumine	50 g/L

Interférences visibles

Les interférences ont été évaluées pour les techniques immunoluminescente et TRACE™. Les seuils d'interférence de diverses substances, testées avec le kit de dosage TRACE™, sont communiqués dans le [Tableau 3](#).

Molécules utilisées pour la calibration

La calibration du kit de dosage repose sur l'utilisation de standards contenant un antigène synthétique copeptine en solution dans du sérum de cheval. Les contrôles de qualité utilisés dans le kit utilisent ce même antigène synthétique.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Holwerda DA. A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization. *Eur J Biochem* 1972;28:334–9.
- [2] Land H, Schutz G, Schmale H, Richter D. Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor. *Nature* 1982;295:299–303.
- [3] Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, Dunser MW. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:43–9.
- [4] Nickel CH, Bingisser R, Morgenthaler NG. The role of copeptin as a diagnostic and prognostic biomarker for risk stratification in the emergency department. *BMC Med* 2012;10:7.
- [5] Barat C, Simpson L, Breslow E. Properties of human vasopressin precursor constructs: inefficient monomer folding in the absence of copeptin as a potential contributor to diabetes insipidus. *Biochemistry* 2004;43:8191–203.

- [6] Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem* 2006;52:112–9.
- [7] Darzy KH, Dixit KC, Shalet SM, Morgenthaler NG, Brabant G. Circadian secretion pattern of copeptin, the C-terminal vasopressin precursor fragment. *Clin Chem* 2010;56:1190–1.
- [8] Jochberger S, Morgenthaler NG, Mayr VD, Luckner G, Wenzel V, Ulmer H, et al. Copeptin and arginine vasopressin concentrations in critically ill patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4381–6.
- [9] Reichlin T, Hochholzer W, Stelzig C, Laule K, Freidank H, Morgenthaler NG, et al. Incremental value of copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:60–8.
- [10] Giannitsis E, Kehayova T, Vafaie M, Katus HA. Combined testing of high-sensitivity troponin T and copeptin on presentation at prespecified cutoffs improves rapid rule-out of non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Chem* 2011;57:1452–5.
- [11] Maisel A, Xue Y, Shah K, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, et al. Increased 90-day mortality in patients with acute heart failure with elevated copeptin: secondary results from the Biomarkers in Acute Heart Failure (BACH) study. *Circ Heart Fail* 2011;4:613–20.
- [12] Muller B, Morgenthaler N, Stolz D, Schuetz P, Muller C, Bingisser R, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur J Clin Invest* 2007;37:145–52.
- [13] Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, Schuetz P, Zweifel C, Bingisser R, et al. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol* 2009;66:799–808.
- [14] Riphagen IJ, Boertien WE, Alkhalaf A, Kleefstra N, Gansevoort RT, Groenier KH, et al. Copeptin, a surrogate marker for arginine vasopressin, is associated with cardiovascular and all-cause mortality in patients with type 2 diabetes (ZODIAC-31). *Diabetes Care* 2013;36:3201–7.